

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THALITA REGINA TULESKI

ENVOLVIMENTO DOS GENES DE BIOSÍNTESE DE CELULOSE NA
FORMAÇÃO DE BIOFILME PELA BACTÉRIA *Herbaspirillum*
rubrisubalbicans M1.

CURITIBA

2013

THALITA REGINA TULESKI

**ENVOLVIMENTO DOS GENES DE BIOSÍNTESE DE CELULOSE NA
FORMAÇÃO DE BIOFILME PELA BACTÉRIA *Herbaspirillum*
rubrisubalbicans M1.**

Dissertação apresentada como requisito parcial a obtenção de grau de Mestre em Ciências (Bioquímica) pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rose Adele Monteiro

Co-orientador: Prof^o Dr^o Emanuel Maltempi de Souza

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

THALITA REGINA TULESKI


**ENVOLVIMENTO DOS GENES DE BIOSÍNTESE DE CELULOSE
NA FORMAÇÃO DE BIOFILME PELA BACTÉRIA**

Herbaspirillum rubrisubalbicans M1.


Dissertação aprovada como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica), pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:


Orientadora: Profª Drª Rose Adele Monteiro

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR


Profº Dr Leonardo Magalhães Cruz

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR


Dr Joseph Albert Medeiros Evaristo
Departamento de Genética – UFPR

Curitiba, 22 de janeiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

À minha família.

Aos meus pais, Mauro e Sônia, e aos meus irmãos, Aline e Álvaro, pelo apoio incondicional ao longo de todos os anos de formação.

Ao meu namorado, Gabriel, pelo apoio e suporte pessoal e acadêmico, pelo incentivo, por estar sempre presente e por todos os momentos essenciais de carinho e descontração. Obrigada pela força e pelo ânimo de todos os dias e, principalmente, obrigada por me fazer esquecer do mestrado tantas vezes.

Aos amigos que estiveram sempre por perto e entenderam, por vezes, a ausência necessária.

Aos colegas e aos amigos de laboratório pela ajuda no dia-a-dia e por fazer a rotina mais agradável.

À todos os professores e técnicos do grupo de Fixação biológica de Nitrogênio.

Aos meus orientadores, Prof^a Dr^a Rose Adele Monteiro e Prof^o Dr^o Emanuel Maltempi de Souza.

Ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica – UFPR.

À Fundação Araucária e ao INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio.

À CAPES-REUNI pelo suporte financeiro

RESUMO

Diversas espécies do gênero *Herbaspirillum* são organismos fixadores de nitrogênio atmosférico capazes de se associar endofiticamente com plantas de interesse econômico, como milho, arroz, trigo, sorgo e cana-de-açúcar. *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* são espécies próximas e apresentam um padrão de colonização contrastante quando inoculadas na variedade B-4362 de cana-de-açúcar. *H. seropedicae* é um diazotrofo que promove o crescimento vegetal e aumenta a produtividade, enquanto *H. rubrisubalbicans* é o causador da doença da estria mosqueada na variedade B-4352 de cana de açúcar e da estria vermelha em variedades susceptíveis de sorgo. Com o objetivo de entender o fenótipo contrastante e identificar os fatores possivelmente relacionados com a interação planta bactéria foram feitas comparações *in silico* entre os genomas das estirpes M1 e SmR1 de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*, respectivamente. Entre as diferenças genômicas observadas foram encontrados genes envolvidos com o metabolismo de lipopolissacarídeos, genes que codificam para adesinas e proteínas efetoras do Sistema de Secreção do Tipo III. Também foi identificado, apenas em *H. rubrisubalbicans*, um cluster envolvido com a biossíntese de celulose (*wss*). A expressão dos genes relacionados com a biossíntese de celulose é aumentada quando a estirpe M1 está aderida a superfície de plântulas de milho. Neste trabalho foi construída uma estirpe mutante de *H. rubrisubalbicans* no gene *wssD* e a análise do seu fenótipo mostrou que a capacidade de formação de biofilme, o número de bactérias colonizando epifiticamente e endofiticamente raízes de milho diminuiu em comparação com a estirpe selvagem M1.. Estes dados mostram que a biossíntese de celulose está relacionada aos processos de interação planta bactéria e que a presença deste cluster de genes em *H. rubrisubalbicans* pode estar envolvido com as diferenças fenotípicas observadas entre as bactérias estudadas

Palavras chave: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, Interação planta-bactéria, exopolissacarídeos, celulose.

ABSTRACT

Several species of *Herbaspirillum* genus are nitrogen fixers capable of endophytic association with important agricultural crops, such as maize, rice, wheat, sorghum and sugar-cane. *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* are closely related species and have a contrasting pattern of colonization when inoculated in the sugar-cane cultivar B4362. *H. seropedicae* is a diazotroph that promotes plant development and increases productivity whereas *H. rubrisubalbicans* causes the mottled stripe disease in that susceptible sugar-cane cultivar and also the red stripe disease in sorghum cultivars. To understand this contrasting phenotype and identify the factors that participate in the plant-bacterial interaction were made genomic comparisons *in silico* between the strain M1 and SmR1 of *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*, respectively. Comparisons were made by analysis *in silico*. Among the genomic differences observed we found genes involved with lipopolysaccharide metabolism, genes coding for adhesins and effector proteins of Type III Secretion System. It was also identified, only *H. rubrisubalbicans*, a cluster involved with cellulose biosynthesis (*wss*). The expression of genes related to the cellulose biosynthesis is increased when the strain M1 is attached to the surface of maize seedlings. In this work it was constructed a mutant strain of *H. rubrisubalbicans* in the gene *wssD* and analysis of its phenotype showed that the biofilm formation capacity, the number of bacteria colonizing endophyte and epiphytically maize roots decreased compared to wild type M1. These data show that the cellulose biosynthesis is related to processes of bacteria plant interaction and that the presence of this gene in *H. rubrisubalbicans* may be involved with phenotypic differences observed between the studied bacteria.

Keywords: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, plant-bacteria interaction, exopolysaccharides, cellulose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Colonização de tecidos de milho e trigo por <i>H. seropedicae</i>	18
Figura 2- Doença da estria mosqueada causada por <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> em cana-de-açúcar	19
Figura 3 – <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> colonizando feixes vasculares de folha de sorgo	20
Figura 4 - Estrutura linear da celulose.....	21
Figura 5 - Via da Biossíntese de celulose em <i>Acetobacter xylinum</i>	22
Figura 6 - Modelo metabólico de biossíntese de celulose em <i>G. xylinus</i>	22
Figura 7 - Organização do cluster de biossíntese de celulose em <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	24
Figura 8 - Esquema ilustrativo da Adesão e formação de biofilme bacteriano.....	26
Figura 9 - Esquema de amplificação de uma região do gene <i>wssD</i> de <i>H.rubrisubalbicans</i>	40
Figura 10 - Os fragmentos de PCR foram clonados no vetor pTZ57R/T dando origem ao plasmídeo pHRTRT1	41
Figura 11 - Esquema de clonagem do cassete Km ao plasmídeo pHRTRT1	42
Figura 12 - Esquema da inoculação das plantas de cana-de-açúcar B-4362 com as estirpes M1 e TRT de <i>H.rubrisubalbicans</i>	52
Figura 13 – Sistema utilizado para obtenção das amostras de película bacteriana observadas em MEV.	54
Figura 14 - Organização do cluster de biossíntese de celulose em <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1	56

Figura 16 - Determinação do número de bactérias aderidas à raiz de milho, 30 minutos após a inoculação, na presença de celulase.	58
Figura 15 – Expressão do gene <i>wssB</i> em células de <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1 crescidas em meio líquido (controle) e aderidas a superfície de raízes e milho 1 e 3 dias após a inoculação.	59
Figura 17 - Gel de eletroforese corado com Brometo de Etídeo evidenciando o produto da reação de PCR com os primers <i>wssD1</i> e 2.	61
Figura 18 - Esquema de clonagem do inserto <i>wssD</i> no vetor pTZ57R/T , originando o plasmídeo pHRTRT1.	62
Figura 19 - Digestão do plasmídeo pUC4K para a obtenção do cassete Km	63
Figura 20 - Plasmídeo pHRTRT1 com o cassete Km inserido no sítios BamHI.	63
Figura 21 - Esquema do plasmídeo pHRTR1 Km ^R	64
Figura 22 - Perfil de crescimento das estirpes M1 e TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i>	66
Figura 23 - Coloração com Vermelho congo evidenciando a menor produção de glucanas pela estirpe TRT em comparação com a estirpe M1.	67
Figura 24 - Ensaio colorimétrico com o corante vermelho congo 0,005% em meio líquido, sem agitação.	67
Figura 25 - Determinação da presença de EPS produzidos pelas estirpes M1 e TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i> através do ensaio de Ligação relativa ao Vermelho Congo (CR).	68
Figura 26 - Verificação de formação de biofilme em matriz inerte, através da coloração com violeta de genciana após 2, 4, 6 e 8 horas de inoculação.	69
Figura 27 - Coloração do Biofilme com calcoflúor. Ensaio de microscopia de fluorescência em lâ de vidro corada com calcoflúor evidenciando a presença de celulose apenas na estirpe M1 de <i>H.rubrisubalbicans</i>	71

Figura 28 - Ensaio de Motilidade realizado com as estirpes M1 e TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i>	74
Figura 29 – Determinação da atividade celulolítica das estirpes M1 e TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i>	76
Figura 30 - Ensaio de Adesão realizado com as estirpes M1 e TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i>	78
Figura 31 - Contagem de bactérias totais realizado com as estirpes M1 e TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i>	79
Figura 32 - Contagem de bactérias endofíticas de raízes de milho inoculados com as estirpes M1 e TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i>	80
Figura 33 - Ensaio de medição do Peso seco e do Peso Fresco de plantas de milho inoculadas com M1 e TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i> após 7 dias de inoculação.....	81
Figura 34 - Ensaio de medição do comprimento da parte aérea e da raiz e a contagem do número de raízes adventíceas de plantas de milho inoculadas com M1 e TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i> após 7 dias de inoculação.	82
Figura 35 - Ensaio de patogenicidade realizado com plantas de Cana de açúcar B-4362 inoculadas com M1 e TRT de <i>H.rubrisubalbicans</i>	84
Figura 36 – Microscopia Eletrônica de Varredura das estirpes M1 e TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i>	86
Figura 37 – Ensaio de Adesão e Competição entre as estirpes M1, TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i> e a estirpe SmR1 de <i>H. seropedicae</i>	88
Figura 38 – Ensaio de Competição epifítica entre as estirpes M1, TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i> e as estirpes RAM10 e SmR1 de <i>H. seropedicae</i> 1 dia após a inoculação	88
Figura 39 – Ensaios de Adesão em Competição com as estirpes M1 e RAM10 de <i>H. seropedicae</i> nas proporções 1:1, 1:10 e 10:1	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTIRPES BACTERIANAS.....	31
TABELA 2– COMPOSIÇÃO DO MEIO LB	32
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO NFBHP-MALATO	32
TABELA 4 – ANTIBIÓTICOS E CONCENTRAÇÕES UTILIZADOS	33
TABELA 5 – DESCRIÇÃO DO PLASMÍDEO UTILIZADO PARA AS CLONAGENS.	40
TABELA 6 - SOLUÇÃO NUTRITIVA PARA PLANTAS PLANT MEDIUM	46
TABELA 7 – PRIMERS UTILIZADOS NAS AMPLIFICAÇÕES DESTE TRABALHO	60
TABELA 8: TAXA DE CRESCIMENTO E TEMPO DE GERAÇÃO DAS ESTIRPES M1 E TRT1 DE <i>H.rubrisubalbicans</i>	66
TABELA 9: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS AMOSTRAS DE EPS PURIFICADAS DAS ESTIRPES M1 E TRT1 DE <i>H.rubrisubalbicans</i>	75

LISTA DE ABREVIATURAS

CMC	=	Carboximetilcelulose
D.A.I.	=	Dias após a inoculação
D.O	=	Densidade ótica
DNA	=	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	=	5'trifosfato de 2' desoxinucleotídeo
EDTA	=	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
EPS	=	Exopolissacarídeo
FBN	=	Fixação biológica de nitrogênio
GFP	=	Do inglês "green fluorescent protein"
kb	=	Quilopares de base
Km	=	Canamicina
kV	=	Quilovolts
L	=	Litro
pb	=	Pares de base nucleotídeos
PCR	=	Reação em cadeia da polimerase
rpm	=	Rotações por minuto
SDS	=	Dodecilsulfato de sódio
Sm	=	Estreptomicina
Tc	=	Tetraciclina
Tris	=	Tris(hidroximetil)-aminometano
TSS	=	do inglês "transformation and storage solution"
U	=	Unidade enzimática
X-gal	=	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 O Gênero <i>Herbaspirillum</i>	17
2.1.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	17
2.1.2 <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	18
2.1.3. Estrutura, biossíntese e função da Celulose em bactérias	20
2.1.4 Comparação genômica entre <i>H. seropedicae</i> x <i>H.rubrisubalbicans</i>	23
2.2 Biofilme	25
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo Geral	30
4.2 Objetivos específicos	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 Bactérias	31
5.1.1 Meios de cultivo para <i>E. coli</i>	31
5.2 Antibióticos.....	33
5.3 Estocagem das bactérias	33
5.4 Preparo de células de <i>E. coli</i> competentes utilizando TSS “Transformation and storage solution”.....	34
5.4.1 Transformação Bacteriana por Choque Térmico	34
5.5 Preparo de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i> estirpe Top10 e <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> estirpe M1	34

5.5.1 Transformação bacteriana por eletroporação	35
5.6 Purificação de Plasmídeos em Pequena Escala.....	35
5.7 Purificação de DNA genômico de <i>H.rubrisubalbicans</i>	36
5.8 Eletroforese de DNA	37
5.9 Clivagem de DNA com Endonucleases de Restrição	37
5.10 Preparo dos Vetores e Insetos para a Clonagem	38
5.11 Ligaç�o de Fragmentos de DNA a Vetores.....	38
5.12 Seq�enciamento de DNA.....	38
5.13 Amplifica�o de Fragmentos de DNA por PCR.....	39
5.14 Mutag�nese dos genes <i>wss</i> de <i>H.rubrisubalbicans</i>	40
5.15 Determina�o da atividade celul�tica das estirpes analisadas	43
5.16 Isolamento de RNA total pelo m�todo do Trizol [®]	43
5.17 S�ntese do cDNA.....	44
5.18 Rea�o de PCR em tempo real	44
5.19 Condi�es da PCR em tempo real.....	45
5.20 Experimentos de intera�o entre as estirpes SmR1 e RAM10 de <i>H. seropedicae</i> , M1 e mutantes de <i>H.rubrisubalbicans</i> em pl�ntulas de milho (<i>Zea mays</i>).	45
5.20.1 Cultivares vegetais.....	45
5.20.2 Desinfec�o das sementes para germina�o	45
5.20.3 Condi�es de cultivo das pl�ntulas de milho	46
5.20.4 Desinfec�o das pl�ntulas de milho (<i>Zea mays</i>) para realiza�o dos ensaios de coloniza�o interna.....	47
5.20.5 Preparac�o dos in�culos de <i>Herbaspirillum sp.</i>	47
5.20.6 In�culo das estirpes bacterianas em milho ou cana de a�u�ar.....	47

5.20.7 Ensaio de adesão das estirpes de <i>Herbaspirillum</i> sp. às raízes de milho	48
5.20.8 Ensaio de colonização epifítica das raízes de milho pelas estirpes de <i>Herbaspirillum</i> sp.	48
5.20.9 Ensaio de colonização interna das raízes de milho pelas estirpes de <i>Herbaspirillum</i> sp.	48
5.20.10 Ensaio de competição das estirpes de <i>Herbaspirillum</i> sp. pela colonização dos tecidos internos das raízes de milho	49
5.21 Medição dos parâmetros de desenvolvimento de milho	49
5.22 Ensaio de formação de Biofilme bacteriano em matriz inerte	50
5.23 Análise da composição monossacarídica	50
5.24 Cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS)	51
5.25 Ensaio de patogenicidade em plantas de cana de açúcar inoculadas com estirpes de <i>H.rubrisubalbicans</i>	51
5.26 Extração de EPS de cultura bacteriana	52
5.27 Ensaio de coloração por Vermelho congo ou calcoflúor.....	53
5.28 Ensaio de Microscopia óptica e Microscopia de Fluorescência.....	53
5.29 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	54
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1 Comparação in silico dos genomas de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 e do genoma parcial de <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1	55
6.2 Análise do operon <i>wss</i> de <i>H.rubrisubalbicans</i> in silico.....	55
6.3 Ensaio de adesão bacteriana a raiz de milho na presença da enzima celulase.....	57
6.4 Análises de PCR quantitativa para avaliação da expressão dos genes <i>wss</i> ..	59

6.5 Construção de organismos mutantes no gene <i>wssD</i> de <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	60
6.6 Caracterização do crescimento bacteriano das estirpes M1 e TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i>	65
6.7 Ensaio de Coloração de celulose com Vermelho congo	66
6.8 Formação de Biofilme em matriz inerte pela bactéria <i>H.rubrisubalbicans</i> estirpes M1 e TRT1.....	69
6.9 Verificação da Formação de biofilme bacteriano em matriz inerte utilizando coloração com calcoflúor.	70
6.10 Ensaio de Motilidade das estirpes M1 e TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i>	72
6.11 Análise da Composição Monossacarídica dos Exopolissacarídeos produzidos pelas estirpes M1 e TRT 1 de <i>H.rubrisubalbicans</i> através de cromatografia gasosa	75
6.12 Determinação da atividade celulolítica das estirpes M1 e TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i>	76
6.13 Ensaio de Interação planta bactéria realizados com a estirpe selvagem de <i>H.rubrisubalbicans</i> M1 e mutante TRT1.....	77
6.14 Determinação dos parâmetros de crescimento da planta de milho 7 dias após a inoculação com as estirpes M1 e TRT1 de <i>H.rubrisubalbicans</i>	81
6.15 Ensaio de Patogenicidade com plantas de Cana-de-açúcar B-4362	83
6.17 Ensaio de Competição entre as estirpes M1 e TRT1 de <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	87
7. CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Herbaspirillum* pertence à classe β das Proteobactérias e compreende organismos fixadores de nitrogênio atmosférico sob condições de microaerofilia. (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992). Dentre as várias espécies descritas estão *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1986; OLIVARES *et al.*, 1997).

H. seropedicae é encontrado em associação com várias plantas de interesse econômico, como milho, arroz e cana-de-açúcar (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992). Esta associação pode trazer benefícios mútuos, aumentando de 34 a 120% o nitrogênio acumulado e, conseqüentemente, o crescimento vegetal (BALDANI *et al.*, 2000).

H. rubrisubalbicans tem um comportamento fitopatogênico quando em associação com a variedade B-4362 de cana-de-açúcar, desencadeando sintomas da doença da estria mosqueada e com variedades susceptíveis de sorgo, causando a doença da estria vermelha. Estas doenças são responsáveis por diminuir a área fotossintética e a vida útil da folha (OLIVARES *et al.*, 1997).

Este trabalho tem como objetivo estudar fatores potencialmente envolvidos no processo de interação planta-bactéria que podem estar relacionados com as diferenças fenotípicas em espécies filogeneticamente próximas.

Análises genômicas comparativas mostram que *H. rubrisubalbicans* possui um operon de biossíntese de celulose, ausente em *H. seropedicae*. A biossíntese de celulose já foi descrita em organismos como *Agrobacterium tumefacis* e *Rhizobium leguminosarum*. Experimentos de adesão a raiz de plantas realizados com estas bactérias mostraram que a celulose é importante para ancorar o microrganismo à superfície da raiz, garantindo uma adesão mais firme e eficiente (MATTHYSSE *et al.*, 1981; AUSMEES *et al.*, 1999). Esses resultados sugerem um padrão de adesão à superfície da planta diferenciado em bactérias produtoras de celulose.

Visando a elucidação de fatores que influenciam os padrões de interação planta-bactéria, uma estirpe mutante de *H. rubrisubalbicans* no gene *wssD* foi construída e teve o seu fenótipo analisado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* pertence à classe β do Filo das Proteobactérias e compreende microrganismos gram-negativos e geralmente vibrióides. As células tem diâmetro estimado em 0,6 e 0,7 μ m, comprimento entre 1,5 e 5 μ m e podem apresentar de 1 a 3 flagelos. Estes organismos fixam nitrogênio atmosférico sob condições de microaerofilia, são aeróbios e não fermentam açúcares (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992).

Dentre as espécies já descritas de *Herbaspirillum*, estão *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1986; OLIVARES *et al.*, 1997).

Aparentemente, a associação entre *H. seropedicae* ou *H. rubrisubalbicans* e gramíneas ocorre com a adesão da bactéria à superfície radicular, seguida pela colonização de pontos das raízes secundárias e ferimentos da epiderme, penetração e espalhamento através dos espaços intercelulares da raiz, aerênquima, feixes vasculares e por fim as porções aéreas (JAMES *et al.*, 1997 e RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003).

2.1.1 *Herbaspirillum seropedicae*

O *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria diazotrófica endofítica encontrada em associação com várias plantas de interesse econômico como milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992).

Estas associações podem trazer benefícios mútuos, aumentando de 34 a 120% o nitrogênio acumulado sem causar danos à planta, e assim, aumentando significativamente o crescimento vegetal (BALDANI *et al.*, 2000), indicando grande potencial desta bactéria como biofertilizante nitrogenado. A colonização ocorre

frequentemente nos espaços intercelulares e nos feixes vasculares (JAMES *et al.*, 1997 e RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003) (Figura 1)

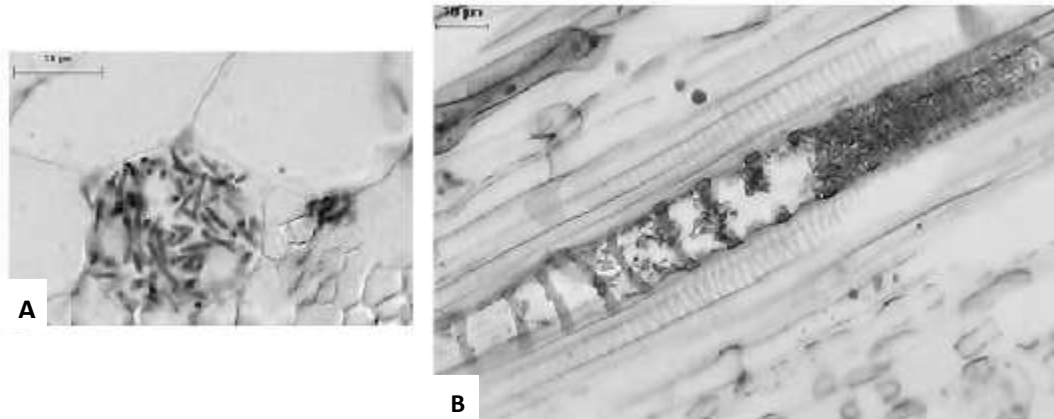


Figura 1 – Colonização de tecidos de milho e trigo por *H. seropedicae* - (A) *H. seropedicae* colonizando os vasos do xilema de milho 15 dias após a inoculação e (B) Corte longitudinal dos vasos do xilema de trigo mostrando a colonização por *H. seropedicae*, após 15 dias de inoculação. Fonte: RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003.

2.1.2 *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

H. rubrisubalbicans é uma espécie fitopatogena, causadora da doença da estria mosqueada na variedade B-4362 de cana-de-açúcar (Figura 2) e estria vermelha em variedades susceptíveis de sorgo. Um sintoma da estria mosqueada é o desenvolvimento de estrias vermelhas com manchas brancas nas folhas de cana-de-açúcar. A bactéria coloniza os vasos do meta e protoxilema (Figura 3) e o bloqueio destes vasos causa necrose ao redor do ponto de inoculação. Vinte dias após a inoculação com *H. rubrisubalbicans* as folhas da cana de açúcar B-4362 exibem uma zona clara delimitada por estrias vermelhas, estes sintomas são relacionados a massiva colonização do xilema, espaços intercelulares e cavidades subestomáticas (OLIVARES *et al.*, 1997). A estria mosqueada aumenta desde o ponto de inoculação em direção ao topo da folha, à medida que a bactéria avança no interior dos vasos da folha (OLIVARES *et al.*, 1997).



Figura 2- Doença da estria mosqueada causada por *Herbaspirillum rubrisubalbicans* em cana-de-açúcar. A figura mostra sintomas típicos da doença da estria mosqueada em cana de açúcar. A estrela indica o ponto de inoculação da bactéria, nota-se o desenvolvimento de estrias vermelhas e necrose do tecido. As flechas indicam os sintomas da doença se manifestando em regiões acima do ponto de inoculação, indicando o avanço das bactérias no interior dos vasos da folha. (FONTE: OLIVARES *et al.*, 1997)

Estas doenças são de pouca importância econômica, afetam poucas variedades e não matam a planta, porém diminuem a área fotossintética e a vida útil da folha (CHRISTOPHER e EDGERTON, 1992; OLIVARES *et al.*, 1997).

Um grande número de células de *H.rubrisubalbicans* podem ser encontrados no interior dos tecidos das folhas, dentro dos vasos do protoxilema, associado a lacunas, e aparentemente bloqueando os vasos completamente. Já a interação com *H. seropedicae* apresenta um número controlado de bactérias (Figura 3) (JAMES *et al.*, 1997).

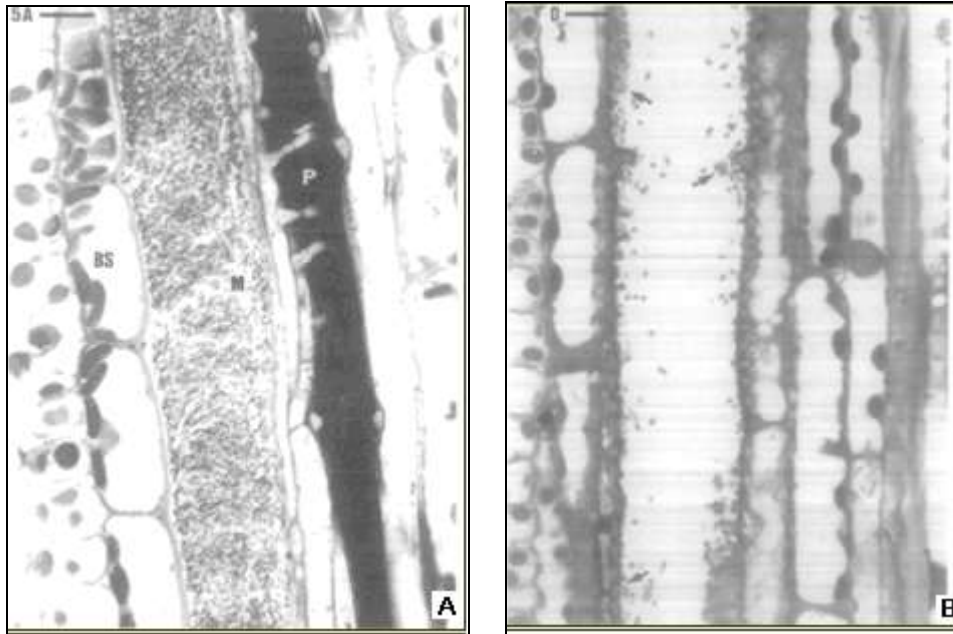


Figura 3 – *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (A) e *Herbaspirillum seropedicae* (B) colonizando feixes vasculares de folha de sorgo. Seções retiradas de áreas de folhas de sorgo mostrando sintomas da doença após 14 dias de inoculação com *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, A- seção longitudinal mostrando o xilema e o floema (P) fortemente colonizados por bactérias, onde M = metaxilema e BS = bainha de células. Em B, seção longitudinal de protoxilema de uma folha de sorgo 14 dias após a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. As bactérias estão concentradas nas paredes dos vasos (setas) e o lúmen do vaso permanece sem células bacterianas (JAMES *et al.*, 1997).

2.1.3. Estrutura, biossíntese e função da Celulose em bactérias

Exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos extracelulares, produzidos por algumas bactérias (KANG *et al.*, 1979). Podem estar relacionados com os sistemas de secreção, regulação de genes, interações célula-célula, simbiose e patogênese.

Na interação entre planta e bactéria os EPS mais comuns são β -1,2 glucanas em *Rhizobiaceae* (HISAMATSU *et al.*, 1987), alguns alginatos em espécies de *Pseudomonas* (FETT *et al.*, 1989) e celulose em espécies de *Agrobacterium* (MATTHYSSE *et al.*, 1983) e *Rhizobium* (SMIT *et al.*, 1987).

A celulose é o polímero orgânico mais abundante no meio ambiente. É produzido por plantas, fungos, algas e algumas bactérias como *Acetobacter xylinus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium spp* e *H.rubrisubalbicans* (DROZANSKI *et al.*, 1983; MATTHYSSE *et al.*, 1983; MONTEIRO *et al.*, 2011). As fibrilas de celulose são altamente insolúveis e inelásticas.

A celulose é constituída por unidades de β -D-Glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). A fibrila de celulose apresenta uma estrutura rígida devido às pontes de hidrogênio intra e intermoleculares (Figura 4).

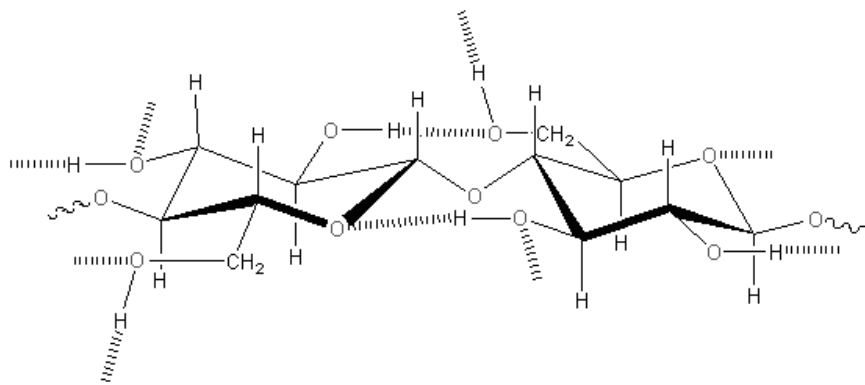


Figura 4 - Estrutura linear da celulose. As pontes de hidrogênio são responsáveis pela formação da estrutura fibrilar e são evidenciadas por linhas pontilhadas. Adaptado de DONINI *et al.*, 2010.

Os mecanismos de biossíntese de celulose em microrganismos são pouco conhecidos (DELMER *et al.*, 1987). A via biossintética em *Acetobacter xylinum* foi estudada por SWISSA *et al.* em 1980 e descrita em quatro passos enzimáticos essenciais (Figura 5). A primeira enzima da via, glucose quinase, é responsável por fosforilar o carbono 6 da glicose, a fosfoglucomutase catalisa a isomerização da Glu-6-P a Glu-1-P, a UDPG pirofosforilase sintetiza UDPG a partir da Glu-1-P e a celulose sintase polimeriza as moléculas de UDPG, formando as microfibrilas de celulose.

A celulose sintase é um complexo protéico constituído de 3 ou 4 subunidades codificadas por genes do operon *bcs/wss*.

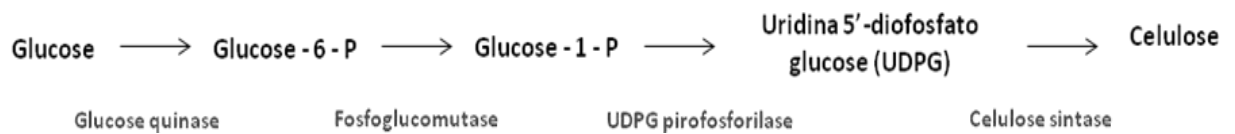


Figura 5 - Via da Biossíntese de celulose em *Acetobacter xylinum*. A via da biossíntese de celulose em *A. xylinum* é descrita em 4 passos essenciais, sendo o último catalisado pelo complexo da celulose sintase, responsável pela polimerização das moléculas de UDPG em fibras de celulose. Adaptado de SWISSA *et al.*, 1980.

Um modelo metabólico hipotético para biossíntese de celulose foi descrito para *Gluconacetobacter xylinus* (Figura 6) (CHÁVEZ-PACHECO *et al.*, 2004).

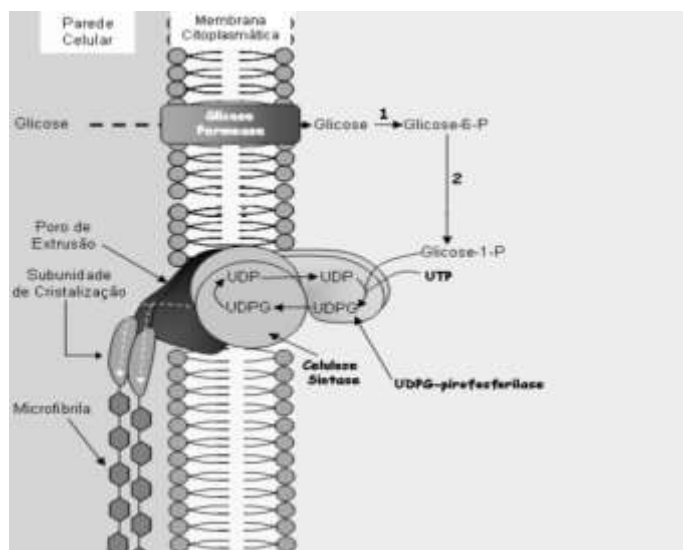


Figura 6 - Modelo metabólico de biossíntese de celulose em *G. xylinus*. (1) Glicose quinase, (2) Fosfoglucomutase. Adaptado de CHAVEZ-PACHECO, 2004 e DONINI, 2010.

Células bacterianas aderidas à superfície secretam exopolissacarídeos com a função de ancorar o microrganismo ao substrato e criar uma matriz extracelular estável, possibilitando a interação planta-bactéria e a formação de biofilme.

Ensaio de mutagênese aleatória feitos com *Salmonella enteritidis* mostraram que mutações no operon de biossíntese de celulose (operon *bcs*) alteram a formação de biofilme. A película formada era frágil e facilmente removida, no entanto o padrão de patogenicidade não foi alterado (SOLANO *et al.*, 2002).

Em *Agrobacterium tumefaciens*, a celulose está envolvida no processo de adesão a raízes e formação de biofilme. Esses dois processos são reduzidos em estirpes deficientes na produção de celulose (MATTHYSSE *et al.*, 1981, MATTHYSSE *et al.*, 1998).

Experimentos realizados por MATTHYSSE, 2005, utilizando uma estirpe de *A. tumefaciens* superprodutora de celulose, mostraram que a superprodução de celulose leva a formação de agregados maiores na superfície da planta, quando comparados com a estirpe selvagem, fazendo com que esta tenha maior sucesso no processo de colonização. Porém, a taxa de crescimento após 4-7 dias da estirpe superprodutora é menor do que a da estirpe selvagem, (MATTHYSSE, 2005).

Experimentos de adesão com as bactérias *Agrobacterium tumefaciens* e *Rhizobium leguminosarum* a raiz de plantas mostraram que a celulose é importante para ancorar a bactéria à superfície da raiz, garantindo uma adesão mais firme e eficiente, mutantes nos genes de biossíntese de celulose apresentaram um padrão diferente de adesão quando comparados às estirpes selvagens (MATTHYSSE *et al.*, 1981; AUSMEES *et al.*, 1999). Esses resultados sugerem um padrão de adesão à superfície da planta diferenciado em bactérias produtoras de celulose. Essa adesão diferenciada pode favorecer a bactéria contra possíveis competidores.

2.1.4 Comparação genômica entre *H. seropedicae* x *H. rubrisubalbicans*

Uma comparação *in silico* feita entre os organismos *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1 evidenciou diferenças entre estes dois organismos. Entre estas diferenças estão proteínas efetoras do Sistema de Secreção do Tipo III, elementos de transposição e um cluster de biossíntese de celulose (*wss*) que está presente em *H. rubrisubalbicans* e totalmente ausente em *H. seropedicae* (Figura 7).

Estes fatores podem estar envolvidos com os diferentes fenótipos observados para estas duas estirpes (MONTEIRO *et al.*, 2012).

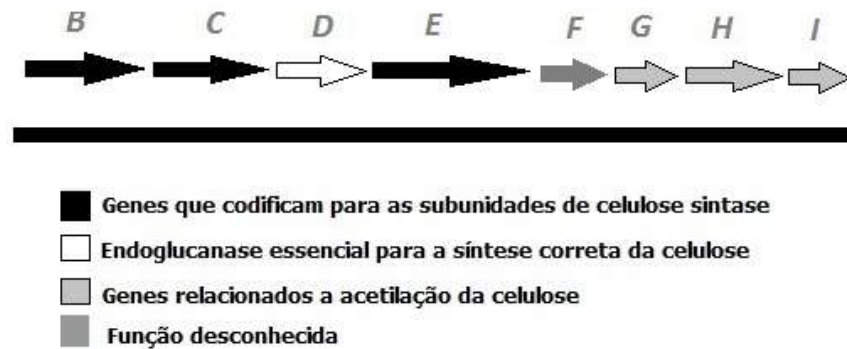


Figura 7 - Organização do *cluster* de biossíntese de celulose em *H.rubrisubalbicans*. Os genes *wssBCE* codificam para proteínas do complexo da celulose sintase; os genes *wssGHI* codificam para proteínas relacionadas ao processo de acetilação da celulose, o gene *wssD* estão envolvidos com a correta síntese da celulose e o gene *wssF* possui função desconhecida. Análises feitas através de comparações com os organismos *P. fluorescences* e *P. syringae* (SPIERS *et al.*, 2003 e RÖMLING *et al.*, 2002 e MONTEIRO *et al.*, 2012).

Olivares e colaboradores (1997) mostraram que o xilema das folhas de cana de açúcar B-4362 está completamente preenchido por *H.rubrisubalbicans*, esse padrão de colonização, que não é observado com *H. seropedicae*, parece ser o responsável pela produção das estrias vermelhas na folha. Podemos então sugerir que a produção de celulose por *H.rubrisubalbicans* pode estar envolvida com esse padrão de espalhamento bacteriano dentro do xilema, sendo, portanto importante para o comportamento fitopatogênico desta bactéria quando inoculada em cana de açúcar B-4362.

Podemos sugerir, portanto, que os genes *wss*, envolvidos na biossíntese de celulose, podem ser importantes para o padrão fitopatogênico de *H.rubrisubalbicans* na variedade B-4362 de cana de açúcar.

2.2 Biofilme

Vários fatores estão envolvidos no processo de interação planta: bactéria. Existem alguns fatores genéticos capazes de modular a interação entre a planta e a bactéria e possibilitar a colonização endofítica. Apesar das bases moleculares da interação entre planta e bactéria serem pouco conhecidas existem alguns fatores sabidamente envolvidos, como a formação de biofilme.

As plantas podem se associar com diversas bactérias em suas raízes, tecidos vasculares e porções aéreas. Esses microrganismos podem ter uma profunda influência na saúde da planta e em sua produtividade. As bactérias podem interagir fisicamente com a superfície e formar complexos multicelulares (FUQUA, 2007).

Em muitos ambientes a forma associativa prevalecente entre a superfície e os microrganismos é conhecida como biofilme. A formação de biofilme é eficiente em favorecer a sobrevivência de microrganismos em microambientes variados (WATNICK e KOLTER, 2000). É, também, altamente vantajosa, pois pode aumentar a resistência ao estresse ambiental bem como a tolerância a antibióticos, promover o desenvolvimento do metabolismo integrado e proporcionar a transferência horizontal de genes (FUQUA, 2007).

A formação do biofilme se inicia pela aproximação entre a bactéria e a superfície. A bactéria forma uma associação estável com a superfície e com outros organismos previamente aderidos. Depois de estabelecidas estas associações: bactéria-bactéria e bactéria-superfície, formando microcolônias, haverá o desenvolvimento do biofilme, que se caracteriza pelo crescimento tridimensional dos microrganismos formando uma película bacteriana imersa em uma matriz extracelular (Figura 8).

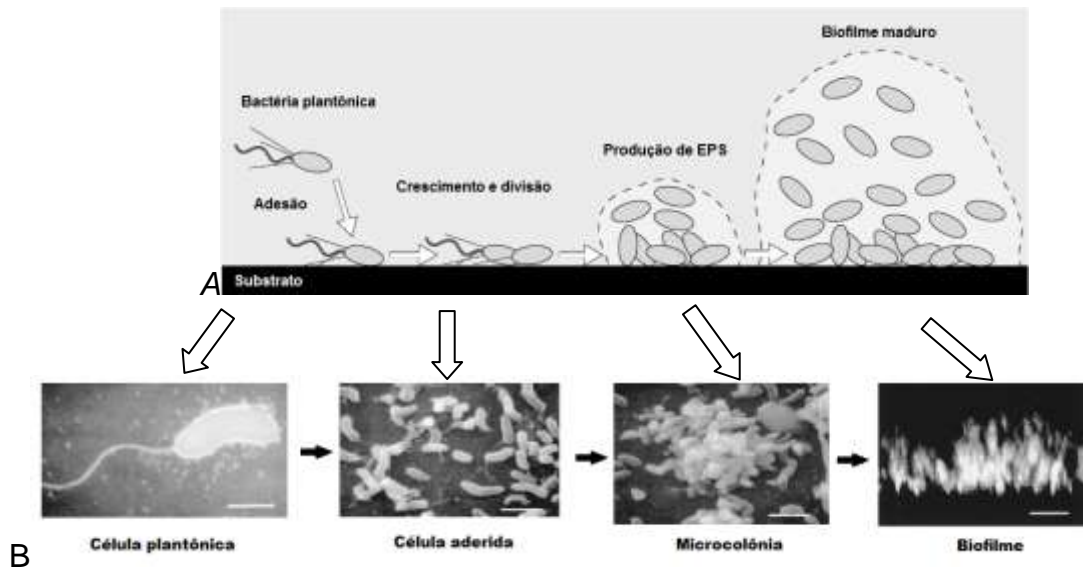


Figura 8 - (A) Esquema ilustrativo da Adesão e formação de biofilme bacteriano. (B) Microscopia da formação de biofilme bacteriano. Microscopia eletrônica de transmissão mostra inicialmente *V. Cholerae* planctônica (Barra = 1 μ M), células aderidas e microcolônia foram observadas em microscopia eletrônica de varredura (Barra = 2 μ M). A micrografia do biofilme representa um corte vertical no biofilme visto por microscopia confocal (Barra = 10 μ M). Fonte: Adaptado de PAULA WATNICK e ROBERTO KOLTER, 2000).

O reconhecimento entre a bactéria e a superfície pode ocorrer por meio de lectinas e carboidratos específicos. Já associação entre elas, chamada de adesão, é um dos primeiros passos para a formação do biofilme. Este contato ocorre por meio de adesinas, polissacarídeos e outras proteínas de superfície (WATNICK, P. e KOLTER, R., 2000).

A estrutura tridimensional do biofilme é composta por agregados de bactérias imersos em uma matriz extracelular permeada por canais ociosos responsáveis por permitir a passagem de água, nutrientes e a difusão de metabólitos tóxicos. (COSTERTON *et al.*, 1995)

Aproximadamente 97% da matriz do biofilme é composta por água, o restante é composto por polímeros secretados. Um estudo feito com *Pseudomonas putida* mostra que a matriz extracelular é composta por água (mais de 97%), células microbianas (2-5%), polissacarídeos (1-2%), proteínas (1-2%) e DNA/RNA (1-2%) (JAHN *et al.*, 2000).

A formação de biofilme é uma forma de manter os microrganismos em um local específico por períodos suficientes para que se iniciem as interações benéficas ou antagônicas com a planta hospedeira (FUQUA, 2007).

É um processo altamente regulado. Cada espécie responde de forma específica aos estímulos ambientais e pode desenvolver uma interação específica com a planta hospedeira.

A formação de biofilme confere uma vantagem a organismos patogênicos. A adesão à superfície é geralmente o primeiro passo da patogênese. *Pseudomonas aeruginosa* forma biofilme nas raízes de *A. thaliana* matando a planta em 7 dias. (WALKER *et al.*, 2004)

Vários fatores podem estar envolvidos com a formação do biofilme bacteriano. A motilidade e a quimiotaxia são fatores importantes para a colonização de *A. brasiliense* (CROES *et al.*, 1993). Um estudo feito com *V. cholerae* identificou alguns destes fatores, sendo que organismos mutantes em genes de vias de secreção, envolvidos com a biogênese e função do pili do tipo IV, genes flagelares e genes envolvidos na síntese de exopolissacarídeos (EPS) tem o desenvolvimento de biofilme prejudicado. Estirpes de *V. cholerae* não produtoras de EPS aderem às superfícies normalmente, mas não apresentam formação de biofilme em nenhuma das condições analisadas, evidenciando sua importância para a formação da estrutura tridimensional do biofilme (WATNICK e KOLTER, 1999).

As bactérias diazotróficas que se associam com as plantas também são capazes de forma biofilme (ASSMUS *et al.*, 1995). *Azospirillum brasiliense* promove o crescimento vegetal e é encontrado em raízes de trigo sob a forma de microcolônias ou agregados bacterianos na zona de alongamento e nos pêlos radiculares preferencialmente, bem como podem ser observadas em tecidos internos das raízes (ASSMUS *et al.*, 1995).

Vários trabalhos demonstram a importância de exopolissacarídeos como a celulose nos processos de interação planta-bactéria e formação de biofilme bacteriano. Sabendo-se da presença deste EPS em *H. rubrisubalbicans* torna-se importante determinar o papel da biossíntese de celulose nesta bactéria e evidenciar possíveis relações entre a celulose e os mecanismos citados acima, bem como sua relação com o fenótipo de patogenicidade observado na associação deste microrganismo com algumas plantas de interesse econômico.

3. JUSTIFICATIVA

Entre os microrganismos diazotróficos endofíticos encontram-se representantes dos gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* e *Azoarcus* (BALDANI *et al.*, 1997). Experimentos de inoculação de gramíneas com alguns destes microrganismos demonstraram o fornecimento da ordem de 30% do nitrogênio necessário para planta (BALDANI *et al.*, 1995).

Duas bactérias diazotróficas-associativas *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* apresentam um fenótipo diferente quando inoculadas na variedade de cana de açúcar B-4362. *H.rubrisubalbicans* causa a doença da estria mosqueada nesta variedade e o *H. seropedicae* não. Como estas duas bactérias podem ser utilizadas como promotoras de crescimento vegetal é necessário definir por que em determinadas plantas, *H.rubrisubalbicans* M1 age como fitopatógeno. Uma das diferenças desses dois organismos tão próximos é a presença, em *H.rubrisubalbicans*, de um cluster de genes envolvidos na biossíntese de celulose, que está ausente em *H. seropedicae*. Esses genes podem estar envolvidos com o fato de *H.rubrisubalbicans* causar doença na variedade B-4362 de cana de açúcar.

Olivares e colaboradores (1997) mostraram que o xilema das folhas de cana de açúcar B-4362 esta completamente preenchido por *H.rubrisubalbicans*. Esse padrão de colonização, que não é observado com *H. seropedicae*, parece ser o responsável pela produção das estrias vermelhas na folha. Podemos então sugerir que a produção de celulose por *H.rubrisubalbicans* pode estar envolvida com esse padrão bacteriano dentro do xilema, sendo, portanto importante para o comportamento fitopatogênico desta bactéria quando inoculada em cana de açúcar B-4362.

Pode-se sugerir, portanto, que os genes *wss*, envolvidos na produção de celulose, podem ser importantes para o padrão fitopatogênico de *H.rubrisubalbicans* em cana de açúcar B-4362.

O papel da celulose na interação entre a bactéria diazotrófica associativa e a planta ainda não foi elucidado. Esse projeto tem como objetivo definir qual a função

da celulose nessa interação e se ela é importante para o comportamento fitopatogênico de *H.rubrisubalbicans* M1.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral elucidar a função da biossíntese de celulose em *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1, determinando se a mutação nos genes *wss* altera o comportamento fitopatogênico de *H.rubrisubalbicans* em cana de açúcar B-4362 e a colonização epifítica e endofítica de raízes de milho por *H.rubrisubalbicans* M1.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar *in silico* o operon *wss* de *H.rubrisubalbicans*, utilizando programas de bioinformática.
- Determinar o padrão de expressão dos genes *wss* de *H.rubrisubalbicans* M1.
- Construir uma estirpe TRT1 - mutante de *H.rubrisubalbicans* M1 no gene *wssD*.
- Determinar a capacidade de produção de celulose e de biofilme da estirpe TRT1 *H.rubrisubalbicans*.
- Testar o padrão da colonização epifítica e endofítica de raízes de milho e cana de açúcar pela estirpe *H.rubrisubalbicans* TRT1.
- Testar se a estirpe TRT1 de *H.rubrisubalbicans* é capaz de causar a doença da estria mosqueada em cana de açúcar B-4362.
- Realizar experimentos de competição entre as estirpes *H.rubrisubalbicans* TRT1, *H.rubrisubalbicans* M1 e *H. seropedicae* SmR1 e RAM10.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Bactérias

As estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho estão descritas abaixo (TABELA 1).

A estirpe de *Escherichia coli* Top 10 foi utilizada para transformação das ligações e obtenção dos clones. As estirpes SmR1 e RAM10 de *Herbaspirillum seropedicae* e M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* também foram utilizadas neste trabalho.

TABELA 1 – ESTIRPES BACTERIANAS

Estirpe	Característica	Referência
Top 10 (<i>E. coli</i>)	<i>hsdR</i> , <i>mcrA</i> , <i>lacZΔM15</i> , <i>recA</i>	INVITROGEN
M1 (<i>H.rubrisubalbicans</i>)	Estirpe selvagem	BALDANI <i>et al.</i> , 1996
TRT1 (<i>H.rubrisubalbicans</i>)	Estirpe tipo M1, <i>wssD</i> ⁻ , Km ^R	Este trabalho
SmR1 (<i>H. seropedicae</i>)	Estirpe tipo Z78, Sm ^R , Nif+	MACHADO <i>et al.</i> , 1996
RAM10 (<i>H. seropedicae</i>)	Estirpe tipo SmR1 Sm ^R , Nif+ , expressando GFP, Km ^R	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2008

5.1.1 Meios de cultivo para *E. coli*

As estirpes de *E. coli* foram crescidas em meio Luria Broth (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989) sob agitação de 160 rpm ou em meio sólido LA, sempre a 37°C.

O meio sólido (LA) é obtido pela adição de ágar (15g/L) ao meio líquido (LB).

O meio LB possui a composição descrita na TABELA 2.

TABELA 2– COMPOSIÇÃO DO MEIO LB

Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio	10 g/L
Triptona	10 g/L

5.1.2 Meios de cultivo para *Herbaspirillum* sp.

As estirpes de *Herbaspirillum* sp. foram crescidas em meio NFbHP Malato (KLASSEN *et al.*, 1997) (TABELA 3) contendo como fonte de nitrogênio 20 mmol/L de NH_4Cl . As culturas foram crescidas sob agitação (120 rpm) por 18 a 24h a 30°C.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO NFbHP-MALATO

	Gramas/Litro
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2
NaCl	0,1
Malato de potássio	5,0
CaCl_2	0,02
Ácido nitrilo triacético	0,056
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,02
Biotina	0,0001
Solução de Oligonutrientes	10 mL
Solução de fosfatos	50 mL

Solução de Oligonutrientes:

	Gramas/Litro
$\text{Na}_2\text{Mo}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,175
H_3BO_3	1,4
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,04
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,12
Água destilada	q.s.p. 1 Litro

Para o preparo dos meios NFbHPN semi-sólido e sólido foram adicionados 0,175 e 1,5% (p/v) de ágar, respectivamente.

5.2 Antibióticos

Os antibióticos utilizados neste trabalho estão descritos na TABELA 4.

TABELA 4 – ANTIBIÓTICOS E CONCENTRAÇÕES UTILIZADOS

Antibiótico	Concentração final para culturas de <i>E. coli</i>	Concentração final para culturas de <i>Herbaspirillum sp.</i>
Ampicilina (Amp)	500 µg/mL	-
Canamicina (Km)	100 µg/mL	500 µg/mL
Estreptomicina (Sm)	20 µg/mL	20 µg/mL

5.3 Estocagem das bactérias

As estirpes de *E. coli* foram inoculadas em 3 mL de meio LB com antibióticos. Foram então incubados a 37°C e 120 rpm por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, 1 mL da cultura foi centrifugada em centrífuga *minispin* Eppendorf® (13400 rpm 1 minuto, temperatura ambiente). O meio de cultura foi descartado e foi adicionado 1 mL de Glicerol 50%. Os clones foram armazenados a -20°C e repicados uma vez por ano.

Para as estirpes de *Herbaspirillum sp.*, as bactérias foram inoculadas em 3 mL de meio NfbHP Malato com antibióticos. Foram então incubados a 30°C e 120 rpm por 24 horas. No dia seguinte 30 µL de cultura foram inoculados em 3mL de meio NfbHP Malato semi-sólido e incubadas por 2 dias em estufa 30°C. As estirpes foram então estocadas a temperatura ambiente e repicadas uma vez a cada 6 meses.

5.4 Preparo de células de *E. coli* competentes utilizando TSS “Transformation and storage solution”

As células de *E. coli* Top 10 foram inoculadas na proporção de 1/100 de cultura saturada em meio LB. As células foram incubadas por 2 a 3 horas a 37°C, sob agitação de 120 rpm. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para microtubos previamente gelados de 1,5 mL e centrifugadas em centrífuga *minispin* Eppendorf® (13400 rpm 1 minuto, temperatura ambiente). Os “pellets” foram ressuspensos em 100 µL de TSS (LB contendo 10% PEG 6000, 50 mM MgCl₂ e 5% DMSO) e a suspensão de bactérias foi utilizada para transformação.

5.4.1 Transformação Bacteriana por Choque Térmico

Para a transformação, plasmídeos íntegros ou ligações foram misturadas à uma suspensão de 100µL de células competentes em glicerol 10%. Após a incubação por 30 minutos em banho de gelo, a mistura foi levada a banho-maria a 42°C por 45 seg. e depois incubada novamente em gelo por 2 minutos. Após esse choque térmico, as células foram recuperadas pela adição de 400µL de meio LB e incubação por uma hora em estufa a 37°C. Após a recuperação, a suspensão de células foi plaqueada em meio LA contendo os antibióticos e indicadores para a seleção dos clones, como X-gal e antibióticos.

5.5 Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli* estirpe Top10 e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe M1

A estirpe Top10 foi crescida em meio LB acrescido com estreptomicina (Sm) 20 µg/mL por 24 horas, a 37°C e 120 rpm, e inoculada em 200 mL de meio LB até

atingir D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,6. A estirpe M1 de *H.rubrisubalbicans* foi crescida durante 6 horas a 30°C e 120 rpm, até atingir D.O.₆₀₀ de 0,6 em meio NfbHP-malato com 1/10 da concentração de fosfato (5mM de tampão fosfato de potássio) e 20mM de NH₄Cl. Ambas as culturas foram então incubadas em banho de gelo por 30 minutos e centrifugadas em tubos de 50 mL a 5000 rpm, por 5 minutos a 4°C. O precipitado de células foi lavado 2 vezes com água Milli Q estéril gelada e 1 vez com Glicerol 15% gelado. Ao final, as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 15% e utilizadas em seguida ou armazenadas a -70°C.

5.5.1 Transformação bacteriana por eletroporação

Para eletrotransformação foram utilizados 100µL de células de *E. coli* – Top 10 ou *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 eletrocompetentes misturadas a 1µL (100 ng, aproximadamente) de ligação/plasmídeo.

A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação previamente resfriada. As amostras foram submetidas a um choque elétrico de 1,8 kV. As células eletroporadas foram recuperadas em 1 mL de meio LB e mantidas por 30 minutos – a 37°C e 120 rpm para *E. coli* e 1 mL de meio NfbHP Malato por aproximadamente 4 horas a 30°C e 120 rpm para *H.rubrisubalbicans*.

Após a recuperação as bactérias foram plaqueadas em meio LA ou NfbHP Malato, contendo canamicina (200 µg/mL), ampicilina (250 µg/mL) e X-gal como substrato para a enzima β-galactosidase na concentração de 30 µg/mL.

5.6 Purificação de Plasmídeos em Pequena Escala

A purificação de plasmídeos foi feita de acordo com o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). A cultura bacteriana, contendo o plasmídeo de interesse, foi coletada por centrifugação e então ressuspensa em 150µL de GET (glucose 50 mmol/L, Tris.HCl 25 mmol/L pH 8.0 e EDTA 10 mmol/L). A lise das células foi feita

pela adição de 150µL da solução de lise (SDS 1% e NaOH 0,18 mol/L) e suave homogeneização por, no máximo, 5 minutos até a neutralização da solução pela adição de 150µL de Kcaf (acetato de potássio 3mol/L pH 4,8 e ácido fórmico 1,8mol/L) e incubação por 15 minutos no gelo. 2 a 3 µL de RNase PureLink (Invitrogen), não fervida, foram adicionados às células em processo de lise, antes da neutralização com Kcaf. Após esse período, o DNA cromossomal, proteínas e fragmentos celulares, foram precipitados por centrifugação por um tempo de 10 minutos. Então, o sobrenadante (cerca de 300 µL) foi coletado por decantação ou com auxílio de uma pipeta e tratado com 100µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo e o DNA plasmidial precipitado com a adição de 2 volumes de etanol 96% ou 0,6 volumes de Isopropanol. Após a homogeneização vigorosa e centrifugação a 13400 rpm em centrífuga Minispin da Eppendorf por 30 minutos, o DNA precipitado foi lavado com 1mL de etanol 70%, seco a vácuo ou a temperatura ambiente, ressuspenso em 30 µL de água ultrapura e estocado a -20°C.

O rendimento e qualidade das purificações foram avaliadas através da aplicação de 3µL da purificação para análise eletroforética em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X.

5.7 Purificação de DNA genômico de *H.rubrisubalbicans*

O DNA genômico de *H.rubrisubalbicans* foi purificado como descrito por SOUZA, 1990. Dez mililitros de cultura de *H.rubrisubalbicans* (D.O.₆₀₀ ≈ 2,0), foi crescida em meio NFbHPN-malato contendo os antibióticos necessários, e centrifugada por 5 min. a 4000 rpm. As células foram lavadas com GET, ressuspendidas em 500µl de GET, incubadas com lisozima (100 µg/mL) e RNase a 30°C durante 1 hora e lisadas pela adição de SDS 1% (p/v). A solução foi incubada com pronase (50 µg/mL) a 37°C por 16 horas, para a degradação das proteínas. A mistura foi extraída com 1 volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) centrifugada e seguida de nova extração com 1 volume de clorofórmio-álcool

isoamílico (24:1). Após a extração, o DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol, lavado com etanol 70%, seco a vácuo e dissolvido em água destilada.

5.8 Eletroforese de DNA

A determinação do perfil eletroforético do DNA foi feita por eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK *et al.*, 1989). Os géis de agarose foram preparados na concentração de 1% em tampão TBE 1x (Tris-base 40 mmol/L pH 8,0, ácido bórico 89 mmol/L, EDTA 2,5 mmol/L). A corrida eletroforética foi feita em gel submerso em tampão TBE, aplicando-se 50 a 60 V durante 2 a 4 horas.

Três microlitros de corante para eletroforese (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% e glicerol 50%) foram adicionados ao DNA, que foi submetido á eletroforese.

Após a eletroforese, os géis foram incubados em uma solução de brometo de etídio (EtBr) a 0,5 ug/mL. O complexo DNA-EtBr foi observado em transiluminador de ultravioleta e registrado.

5.9 Clivagem de DNA com Endonucleases de Restrição

A digestão de DNA com enzimas de restrição foi feita segundo as recomendações especificadas pelos fabricantes INVITROGEN ou FERMENTAS. Para a confirmação das clonagens as reações foram feitas em volume final de 10 uL com 3 a 5 µL (0,1 a 0,3 µg) de DNA. Após a incubação por tempo determinado pelo fabricante, todo o volume de restrição foi aplicado em gel de agarose para análise.

5.10 Preparo dos Vetores e Insetos para a Clonagem

A preparação dos vetores, bem como dos insetos para a clonagem foi feita através da clivagem dos plasmídeos de interesse com as enzimas de restrição adequadas, em uma reação com volume final de 100 μL , contendo de 30 a 60 μL (aproximadamente 20 a 30 μg) do plasmídeo, cerca de 10 unidades de enzima e incubação por tempo determinado pelo fabricante. Ao final do tempo de incubação, 1 μL da reação foi analisado por eletroforese para confirmação da restrição total. Todo o volume restante da reação de restrição (99 μL) foi aplicado em gel de agarose para separação e posterior recuperação dos fragmentos através da utilização dos kits ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). A porcentagem de recuperação de DNA a partir dos kits de purificação foi estimada visualmente em uma corrida eletroforética onde foram aplicados: 1 μL do vetor ou inserto antes da recuperação do DNA do gel e 1 μL do vetor ou inserto.

5.11 Ligação de Fragmentos de DNA a Vetores

O vetor (linearizado) e o inserto foram ligados numa razão molar de aproximadamente 1:1. O volume do sistema de ligação foi de 10 μL utilizando o tampão da T4 DNA ligase (FERMENTAS) na concentração de 1X, juntamente com 0,2 a 0,5 U da enzima T4 DNA ligase (FERMENTAS). O sistema de ligação foi incubado durante 20 horas a 20°C.

5.12 Seqüenciamento de DNA

Foi utilizado o método descrito por SANGER *et al.*, 1977 utilizando dideoxynucleotídeos fluorescentes, separação em eletroforese capilar e detecção de fluoróforos após excitação com laser em seqüenciador automático ABI3500.

A reação foi feita com aproximadamente 250ng de DNA, 3,25 pmol de primer Universal, Reverso ou primer adequado para sequenciamento, 3µL de reativo ET terminador Mix e água Milli Q para completar 7,5 uL. A reação de seqüenciamento foi feita em termociclador Mastercycler Gradient da Eppendorf sob as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 1 minuto, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 2 minutos para os primers Universal/Reverso e temperatura adequada para os demais primers e 72°C por tempo adequado para amplificação.

O produto da reação foi precipitado com adição de 12,5 µL de água Milli Q, 60 µL de Isopropanol e 3 µL de Acetato de Amônio 7,5M. Depois de centrifugado por 45 minutos, o DNA foi lavado com 150µL de Etanol 70% e centrifugado por mais 15 minutos. Depois de completamente secas, as amostras foram ressuspensas em solução adequada e aplicadas no seqüenciador automático.

As seqüências obtidas no formato FASTA foram submetidas a análise no banco de dados do NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>).

5.13 Amplificação de Fragmentos de DNA por PCR

As amplificações dos fragmentos dos genes *wss* de *H.rubrisubalbicans* foram feitas pelo método de reação em cadeia da polimerase ou PCR (MULLIS & FALOONA, 1987; SAIKI, *et al.*, 1988). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram desenhados com base nas seqüências dos genes de interesse disponibilizadas pelo Programa GENOPAR (www.genopar.org). Antes da síntese química dos oligonucleotídeos, pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies), estes foram analisados através das ferramentas do Programa OligoAnalyzer (OWCZARZY, *et al.*, 2008) disponíveis em: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.asp>.

Nas reações de amplificação foram utilizados de 0,2 a 0,5 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas), tampão para a Taq na concentração de 1X no volume final de reação, 0,2 mol/L de dNTPs, 0,1 a 1 µM de cada oligonucleotídeo 1,5 mmol/L de MgCl₂ e aproximadamente 20 ng de DNA molde em um volume final de reação de 10 µl ou 50 µl. O DNA molde foi obtido por separação de plasmídeos

por lise alcalina, purificação de DNA genômico ou a partir de culturas bacterianas fervidas, para rompimento celular e exposição do DNA genômico.

5.14 Mutagênese dos genes *wss* de *H.rubrisubalbicans*

Com o objetivo de construir estirpes mutantes *wss* de *H.rubrisubalbicans* uma região do gene *wssD* selvagem foi amplificada (Figura 9) e clonada em TA no vetor pTZ57R/T (TABELA 5) (Figura 10).

TABELA 5 – DESCRIÇÃO DO PLASMÍDEO UTILIZADO PARA AS CLONAGENS

Plasmídeo	Característica	Referência
pTZ57R/T	AmpR , 3'-T p/ ligação de fragmentos de DNA amplificados pela <i>Taq</i>	FERMENTAS

Fonte: Fermentas

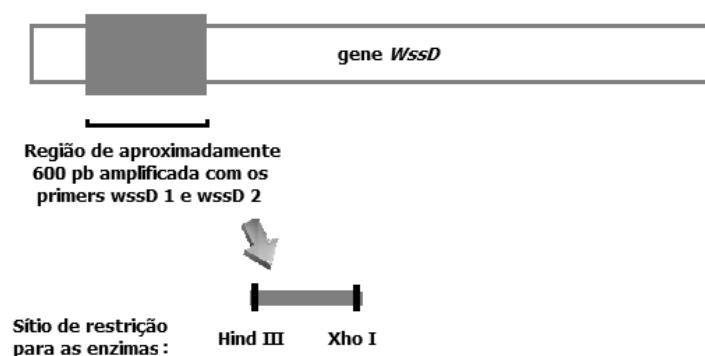


Figura 9 - Esquema de amplificação de uma região do gene *wssD* de *H.rubrisubalbicans*. O gene *wssD* possui aproximadamente 1.5kb; utilizando-se os primers *wssD1* e *wssD2* foi amplificado um fragmento de aproximadamente 600 pb. Os primers utilizados inseriram sítios de restrição para as enzimas Hind III e Xho I.

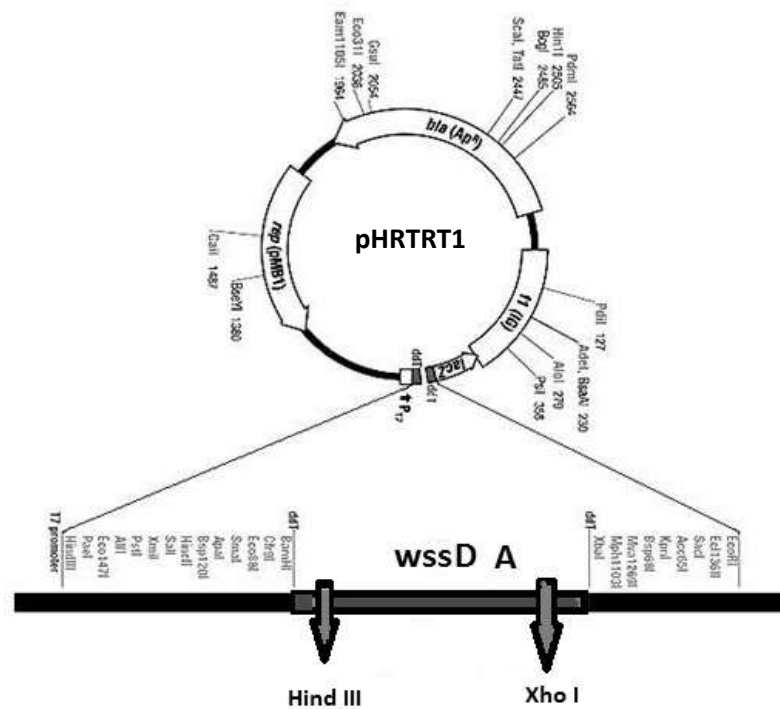


Figura 10 - Os fragmentos de PCR foram clonados no vetor pTZ57R/T dando origem ao plasmídeo pHRTRT1. Os fragmentos de DNA oriundos da amplificação com os primers *wssD1* e *wssD2* foram ligados em TA no vetor pTZ57R/T (FERMENTAS) por 24 horas nas condições adequadas.

A orientação do inserto foi confirmada por análises de restrição com as enzimas adequadas.

Um cassete Km foi retirado do vetor pUC4K e inserido no plasmídeo pHRTRT1 a montante do inserto através do sítio de restrição *Bam*HI como demonstrado na Figura 11.

O plasmídeo pHRT1 construído foi então eletrotransformado na estirpe M1 de *H.rubrisubalbicans* e as possíveis estirpes mutantes foram selecionadas pela adição do antibiótico canamicina. A inclusão da região do gene *wssD*, teve como objetivo aumentar o grau de homologia entre o vetor construído e o genoma de *H.rubrisubalbicans*, favorecendo desta forma a recombinação homóloga.

Ocorreu a recombinação homóloga simples entre o fragmento do gene *wssD* plasmidial o gene selvagem, levando a inserção do vetor inteiro no locus gênico alvo e interrompendo a expressão do operon pela inserção do cassete de resistência a canamicina e pelo próprio vetor. Ao final da construção houve a obtenção da estirpe TRT1 de *H.rubrisubalbicans* (Estirpe do tipo M1, *wssD*⁻, KM^R)

5.15 Determinação da atividade celulítica das estirpes analisadas

O ensaio foi realizado de acordo com KASANA, R. C., 2008. As estirpes foram inoculadas em placas de meio LA contendo 0,2% de Carboximetilcelulose (CMC). As bactérias foram inoculadas e crescidas por 4 dias a 30°C. Após o crescimento, as placas foram coradas por 5 minutos com uma solução de lodo de Gram (2 g de KI e 1 g de iodo em 300 mL de água destilada), o excesso de solução foi descartado e os halos evidenciados.

5.16 Isolamento de RNA total pelo método do Trizol[®]

A estirpe M1 de *H.rubrisubalbicans* foi cultivada nas condições adequadas e as células foram lisadas com SDS. 1,5 mL da cultura foi centrifugada a 13.400 rpm por 60 segundos. O sobrenadante foi descartado e 1 mL do reagente de Trizol[®] (TRI[®] Reagent – Sigma) foi adicionado. A solução foi homogeneizada e deixada a temperatura ambiente por 5 minutos. Foi adicionado então 200 µL de clorofórmio, misturado vigorosamente por 15 segundos e a amostra foi incubada por 2-3 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada (13.400 rpm, 5 minutos) e a

fase aquosa, contendo o RNA, foi transferida para um novo tubo. O RNA foi precipitado com 500 μL de isopropanol, lavado com etanol 75% e ressuspensão em 50 μL de água ultrapura livre de RNase. O RNA foi visualizado em gel de agarose e quantificado com aparelho de NanoDrop (THERMO Scientific).

5.17 Síntese do cDNA

As moléculas de cDNA foram sintetizadas por transcrição reversa, utilizando o Kit High Capacity (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo do fabricante a partir de 2 μg de RNA total tratado previamente com DNase I.

5.18 Reação de PCR em tempo real

O sistema de reação total continha um volume de 5 μL , sendo: 1 μL de cDNA, 1 μL de oligonucleotídeos (0,5 μL de cada em uma concentração de 10 pmol), 0,5 μL de água ultra pura livre de RNase e 2,5 μL de *SYBRGreen PCR Master Mix* (Applied Biosystems) em triplicata.

O software Primer express 3.0 foi utilizado para determinar a sequência dos primers *wssBF* (5'- CGACATCTGGGCCAACAACT-3') e *wssBR* (5'- TGCCAATGCCCGTGACTT-3'). O gene 16sRNA (primers HR16SF5'- AAGCCTACCAAGGCGACGACGAT-3' e HR16SR 5'-AGGAGTCTGGGCCGTGT CT-3') foi utilizado como controle interno e a expressão relativa do gene foi determinada usando o método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

5.19 Condições da PCR em tempo real

O RNA foi obtido de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 aderido a raiz de milho. As plântulas foram inoculadas com 10^5 bactéria por plântula, durante 30 minutos. As células aderidas a superfície da raiz de milho foram recuperadas 1 e 3 dias após a inoculação através de agitação mecânica (vórtex, 20 segundos).

As células recuperadas foram então utilizadas para a extração de RNA e quantificação por PCR em tempo real.

5.20 Experimentos de interação entre as estirpes SmR1 e RAM10 de *H. seropedicae*, M1 e mutantes de *H. rubrisubalbicans* em plântulas de milho (*Zea mays*).

Foram realizados experimentos de colonização interna, adesão e competição com as estirpes SmR1 de *H. seropedicae*, M1 TRT1 de *H. rubrisubalbicans*.

5.20.1 Cultivares vegetais

Neste trabalho foram utilizadas plântulas de milho (*Zea mays*) das variedades SHS 3031 e SHS 5055 e plântulas de cana de açúcar (*Saccharum sp.*) da variedade B-4362.

5.20.2 Desinfecção das sementes para germinação

As sementes de milho foram desinfetadas por 20 minutos em uma solução de hipoclorito 1%, 0,4% de tween 20% e água Milli Q estéril q.s.q 100mL e por mais 5

minutos em Etanol 70%. As sementes foram então lavadas 4 vezes com água MilliQ por um tempo de aproximadamente 1 minuto.

5.20.3 Condições de cultivo das plântulas de milho

Depois de desinfetadas as sementes foram germinadas em placas de ágar-água 1% por 48-72 horas a 28 - 30°C.

Após a germinação e inoculação as plântulas foram transferidas para tubos de ensaio de aproximadamente 30 cm contendo 5 mL de esferas de polipropileno (para dar sustentação a semente) e 20 mL de solução Plant Medium (TABELA 6) por 2-3 dias.

TABELA 6 - SOLUÇÃO NUTRITIVA PARA PLANTAS PLANT MEDIUM

	1L
MgSO ₄ . H ₂ O – 10%	0,2g
NaCl – 10%	0,1g
CaCl ₂ . 2. H ₂ O – 1%	0,026g
Solução de Microelementos	1mL
Fe-EDTA – 1,64%	1mL
K ₂ HPO ₄	1,5g
KH ₂ HPO ₄	1,5g

Solução de microelementos:

Na ₂ MoO ₄ . 2.H ₂ O	1g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	1,175g/L
H ₃ BO ₃	1,4g/L
CuSO ₄ . 5.H ₂ O	0,04g/L
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,12g/L

5.20.4 Desinfecção das plântulas de milho (*Zea mays*) para realização dos ensaios de colonização interna

Após 1, 3, ou 7 dias de inoculação as plântulas de milho foram desinfetadas superficialmente por uma lavagem com hipoclorito 1% por 2 minutos; seguida de uma lavagem com Etanol 70% por 2 minutos e, por fim, duas lavagens sucessivas com água MilliQ estéril por 2 minutos para sucessivos ensaios de colonização interna.

5.20.5 Preparação dos inóculos de *Herbaspirillum sp.*

As estirpes de *Herbaspirillum sp.* foram crescidas em meio NFbHPN-malato e antibiótico por aproximadamente 24 horas até atingirem D.O.₆₀₀ de 1,0. Foram então diluídas até a concentração de 10^5 células/mL.

5.20.6 Inóculo das estirpes bacterianas em milho ou cana de açúcar

Após 3 dias de germinação das sementes, as plântulas foram submersas por 30 minutos sem agitação em meio de cultura bacteriano contendo 10^5 células por mL. As plântulas foram então lavadas com solução salina (NaCl 0,9%) e transferidas para os tubos de ensaio.

As plantas foram mantidas a 25°C e sob luz artificial com fotoperíodo de 12 horas. As plântulas foram retiradas para os experimentos de colonização e competição no primeiro, terceiro e sétimo dia após o inóculo.

5.20.7 Ensaio de adesão das estirpes de *Herbaspirillum* sp. às raízes de milho

Imediatamente após a inoculação, as amostras de raiz (aproximadamente 0,03 g de raiz úmida) foram cortadas, pesadas e lavadas duas vezes por imersão em solução salina estéril (NaCl 0,9%), foram então vortexadas vigorosamente por 45 segundos em 1 mL da mesma solução. O sobrenadante foi utilizado para determinar o número de bactérias aderidas por grama de raiz de milho úmida através de diluição seriada e contagem em meio sólido. Os valores obtidos representam a média de pelo menos três experimentos independentes, com 5 plantas cada.

5.20.8 Ensaio de colonização epifítica das raízes de milho pelas estirpes de *Herbaspirillum* sp.

A determinação do número de bactérias epifíticas foi realizada 1, 3 e 7 dias após inoculação. As raízes foram cortadas, pesadas e lavadas duas vezes por imersão em solução salina estéril (NaCl 0,9%), foram então vortexadas vigorosamente por 45 segundos em 1 mL da mesma solução. O sobrenadante foi utilizado para determinar o número de bactérias aderidas por grama de raiz de milho úmida através de diluição seriada e contagem em meio sólido. Os valores obtidos representam a média de pelo menos três experimentos independentes, com 5 plantas cada

5.20.9 Ensaio de colonização interna das raízes de milho pelas estirpes de *Herbaspirillum* sp.

A determinação do número de bactérias endofíticas foi realizada 1, 3 e 7 dias após inoculação. As raízes foram superficialmente desinfetadas, cortadas e pesadas

como descrito acima. As amostras foram então maceradas em grau estéril com 1mL de solução salina (NaCl 0,9%). Os extratos foram utilizados para determinar o número de bactérias endofíticas colonizando os tecidos radiculares internos de milho, através de diluição seriada e contagem em meio sólido. Os valores obtidos representam a média de pelo menos três experimentos independentes, com 5 plantas cada.

5.20.10 Ensaio de competição das estirpes de *Herbaspirillum* sp. pela colonização dos tecidos internos das raízes de milho

Ensaio de competição pela colonização de milho foram realizados utilizando as estirpes RAM10 (GFP, Sm, Km) de *H. seropedicae*, M1 de *H. rubrisubalbicans* e TRT1 de *H. rubrisubalbicans* (*wssD*⁻) em proporção de 1:1 e 1:10, mantendo o total de 10^5 UFC.mL⁻¹ de inóculo por planta. A determinação das UFC foi realizada como descrito anteriormente, e a resistência a antibióticos e produção de GFP foram utilizadas para identificar as estirpes. Os valores obtidos representam a média de pelo menos três experimentos independentes, com 5 plantas cada.

5.21 Medição dos parâmetros de desenvolvimento de milho

Foram feitos ensaios para medição dos parâmetros da planta. As plantas foram inoculadas e cultivadas como descrito acima. Após 7 dias de inoculação foram feitas medidas do comprimento foliar e radicular, do peso seco foliar e radicular, do peso úmido foliar e radicular e do número de raízes adventícias.

5.22 Ensaio de formação de Biofilme bacteriano em matriz inerte

O ensaio de biofilme foi realizado com a inoculação das estirpes de *Herbaspirillum* sp. por períodos determinados na presença de 50 mg de lã de vidro. As estirpes foram incubadas a 30°C, 120 rpm pelo tempo necessário para o ensaio. Após a incubação, a lã de vidro foi recuperada, lavada com solução de NaCl 0,9% e corada com 200 µL de violeta de genciana por aproximadamente 5 minutos. Após o processo de coloração, a lã de vidro foi lavada 5 vezes com solução de NaCl para retirada do excesso de violeta de genciana. Foi então adicionado 1 mL de Etanol 70% para descorar a lã de vidro e após descoloração foi lida a D.O. ₅₅₀ da solução para determinação da presença de biofilme.

5.23 Análise da composição monossacarídica

Aproximadamente 2 mg das frações obtidas foram hidrolisadas com TFA 1M durante 8 horas, 100°C (GORIN *et al.* 1996). O ácido foi então evaporado e o material resultante foi ressuscitado em água e submetido a redução com NaBH₄ por 12 horas em TA (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). A solução foi tratada com resina catiônica (DOWEX 50W x 8, forma H⁺) até pH4, para remoção dos íons sódio.

Os derivados alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético:piridina (1:1, v/v) (WOLFROM e THOMPSON, 1963b) por 12 horas em TA. Os alditóis obtidos foram extraídos com clorofórmio e a fase clorofórmica foi lavada sucessivas vezes com solução aquosa de CuSO₄, a 3% (m/v) para remoção da piridina residual. Para promover a total desidratação da fase clorofórmica, sulfato de sódio foi adicionado. Os alditóis acetatos foram então analisados por GC-MS.

5.24 Cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS)

Os componentes monossacarídicos foram quantificados através do cromatógrafo gasoso Varian, modelo 3800, acoplado ao espectrômetro de massa Saturn 200R (GC-MS) utilizando coluna DB-225 (30m x 0,25mm). Durante a injeção da amostra a temperatura foi de 50°C sendo programada para aumentas 40°C.min⁻¹ até atingir a temperatura de 220°C para análise de alditol acetato. Hélio foi utilizado como gás de arraste.

5.25 Ensaio de patogenicidade em plantas de cana de açúcar inoculadas com estirpes de *H.rubrisubalbicans*.

Aproximadamente 70 dias após a germinação dos colmos de cana de açúcar as plantas foram inoculadas com 10⁸ bactérias das estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*. As bactérias foram inoculadas com uma seringa hipodérmica e agulha fina em um volume de 0,7 mL na região do colmo, 2 a 3 centímetros abaixo da primeira folha. Após a inoculação as plantas foram podadas para incentivar a passagem de seiva pelos vasos do xilema e por consequência o espalhamento das bactérias pelos tecidos da planta. As plantas foram então envolvidas com saco plástico, formando uma câmara úmida, para evitar o dessecamento da planta (Figura 12).

As plantas foram observadas durante 30 dias para acompanhar o desenvolvimento do fenótipo de patogenicidade.

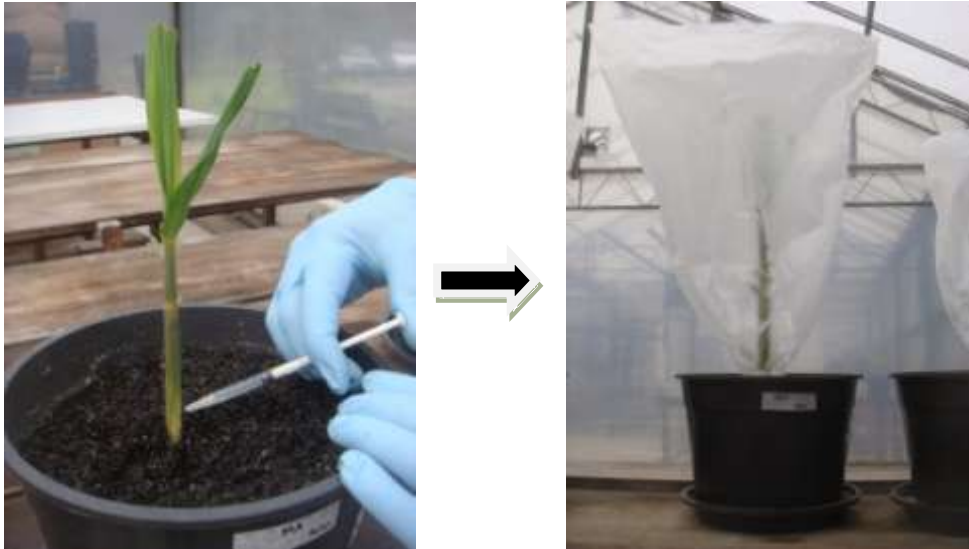


Figura 12 - Esquema da inoculação das plantas de cana-de-açúcar B-4362 com as estirpes M1 e TRT de *H.rubrisubalbicans*.

5.26 Extração de EPS de cultura bacteriana

Uma cultura de *H.rubrisubalbicans* foi crescida em 5 mL de meio NfbHP Malato por 24 horas, 30°C e agitação de 120 rpm na presença de 50 mg de lã de vidro para formação do biofilme aderido a lã. No dia seguinte a lã de vidro foi coletada e vortexada por aproximadamente 10 minutos para liberação das bactérias e da matriz extracelular formadora do biofilme. A lã de vidro foi descartada e a solução centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm. Ao sobrenadante foi adicionado 3 volumes de Etanol Absoluto para precipitação de polissacarídeos a 4°C, durante a noite. No dia seguinte a solução foi centrifugada a 4°C, 5000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco em bomba de vácuo por 20 minutos ou até que o Etanol evapore completamente. Os polissacarídeos precipitados foram ressuspensos em 50uL de água milliQ para posterior análise.

5.27 Ensaio de coloração por Vermelho congo ou calcoflúor

A coloração com vermelho congo foi feita adicionando vermelho congo no meio NfbHP-Malato semi sólido na concentração de 0,005%.

A mesma concentração foi adicionada ao meio líquido, e a cultura bacteriana foi crescida por 2 dias, sem agitação, até que ocorra a formação de película. A película formada, e já corada, foi recuperada, vortexada, centrifugada e a densidade óptica do sobrenadante foi lida no comprimento de onda de 550 nm.

Os dados de D.O. foram normalizados considerando o ensaio feito com a estirpe SmR1 com o valor 1 (a estirpe SmR1 não possui os genes de biossíntese de celulose).

Para a coloração com calcoflúor foi realizado um ensaio de biofilme em matriz inerte. Após crescimento bacteriano de *Herbaspirillum sp.* na presença da 50 mg de lã de vidro por 24 horas, a lã de vidro foi recuperada e corada com 50mM de calcoflúor por 1 hora. Após a coloração, a lã de vidro foi observada em microscopia de fluorescência.

5.28 Ensaio de Microscopia óptica e Microscopia de Fluorescência

Os ensaios feitos na presença de calcoflúor foram observados em microscopia óptica e de fluorescência. Após o crescimento das estirpes bacterianas em matriz inerte por 24 horas, a lã de vidro foi corada com calcoflúor, como descrito no item 5.27 e observado em microscopia óptica de luz e de fluorescência (luz UV – 360nm) em microscópio Carl Zeiss Jena; as imagens foram obtidas utilizando câmera AxioCam acoplada ao microscópio e o software AxioVision L.E. 4.6. foi utilizado para obtenção das imagens.

5.29 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para visualização do padrão de formação de biofilme, as bactérias foram crescidas em placas de petri contendo meio NfbHP Malato líquido e lamínulas de vidro, de aproximadamente 1 cm de diâmetro, como mostrado na Figura 13. Após 72 horas de crescimento em estufa 30°C, sem agitação, as lamínulas foram recuperadas, fixadas e preparadas, como descrito abaixo, para a MEV.

Após fixação em Karnovisky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 a 4°C) (Karnovsky, 1965), o material foi desidratado em série alcoólica crescente e acetona, sendo o ponto crítico obtido em um Bal-Tec CPD – 030 com gás carbônico. Em seguida ocorreu a metalização em ouro obtida em um Balzers SCD – 030. As análises e a documentação do material foram feitas no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV do Centro de Microscopia Eletrônica – Universidade Federal do Paraná.

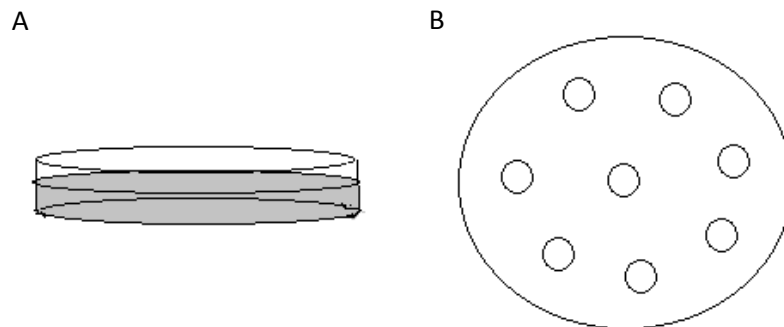


Figura 13 – Sistema utilizado para obtenção das amostras de película bacteriana observadas em MEV. As estirpes bacterianas foram inoculadas em placas de petri, contendo meio líquido e lamínulas de 1 cm de diâmetro acondicionadas no fundo da placa. Em (A), vista lateral da placa indicando, em cinza, o meio de cultura adicionado, em (B) vista superior da placa, indicando a disposição das lamínulas de vidro. Após 72 horas, a película bacteriana formada aderiu às lamínulas; estas foram recuperadas e preparadas para observação em MEV.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Comparação *in silico* dos genomas de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e do genoma parcial de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1

A sequência genômica de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 foi comparada *in silico* para identificação das diferenças gênicas entre elas que possam estar relacionados com o comportamento diferenciado dessas duas bactérias quando inoculadas no mesmo cultivar de cana de açúcar. Para comparar o conteúdo gênico destas duas estirpes foram alinhados contigs de *H.rubrisubalbicans* M1 com o genoma de *H. seropedicae* SmR1 (PEDROSA, F. O. et al., 2011) através dos programas Phred/Phrap/Consed (www.phrap.org). Os contigs resultantes foram alinhados com as sequências genômicas de *H. seropedicae* (NC_014323) e as regiões codificadoras de proteínas em potencial foram identificadas pelo banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). As regiões com menos de 75% de identidade com *H. seropedicae* foram consideradas diferenciais – exclusivas de *H.rubrisubalbicans* M1 (MONTEIRO, et al., 2012).

Como resultado desta análise foram encontrados genes relacionados a biossíntese de celulose em *H.rubrisubalbicans* M1. A comparação genômica mostrou a presença de um *cluster* de genes envolvidos na biossíntese de celulose no genoma de *H.rubrisubalbicans* que está ausente em *H. seropedicae* e que foi identificado como operon *wss*.

6.2 Análise do operon *wss* de *H.rubrisubalbicans in silico*

O cluster de genes envolvidos com a biossíntese de celulose em *H.rubrisubalbicans* tem oito genes que codificam para as proteínas YhjQ, WssB, WssC, WssD, WssE, WssF, WssG, WssH e WssI (Figura 14). O gene *yhjQ* foi identificado a montante dos genes que codificam para a celulose sintase bacteriana.

Este gene está presente em um grande número de organismos, mas sua função é desconhecida (KIM *et al.*, 2002). A comparação de aminoácidos das proteínas Wss de *H.rubrisubalbicans* M1 com as proteínas Wss de *Pseudomonas fluorescens* e *P. syringae* (SPIERS *et al.*, 2003), mostrou que as proteínas WssB, WssC e WssE correspondem às subunidades da enzima celulose sintase. A proteína WssD é uma endo-1,4-glucanase necessária para a biossíntese de celulose em *Acetobacter xylinus* (ROMLING *et al.*, 2002). As proteínas WssG, WssH e WssI são homólogas à enzima celulose acetilase, indicando que a celulose sintetizada por *H.rubrisubalbicans* M1 seja uma forma modificada de celulose (celulose acetilada).

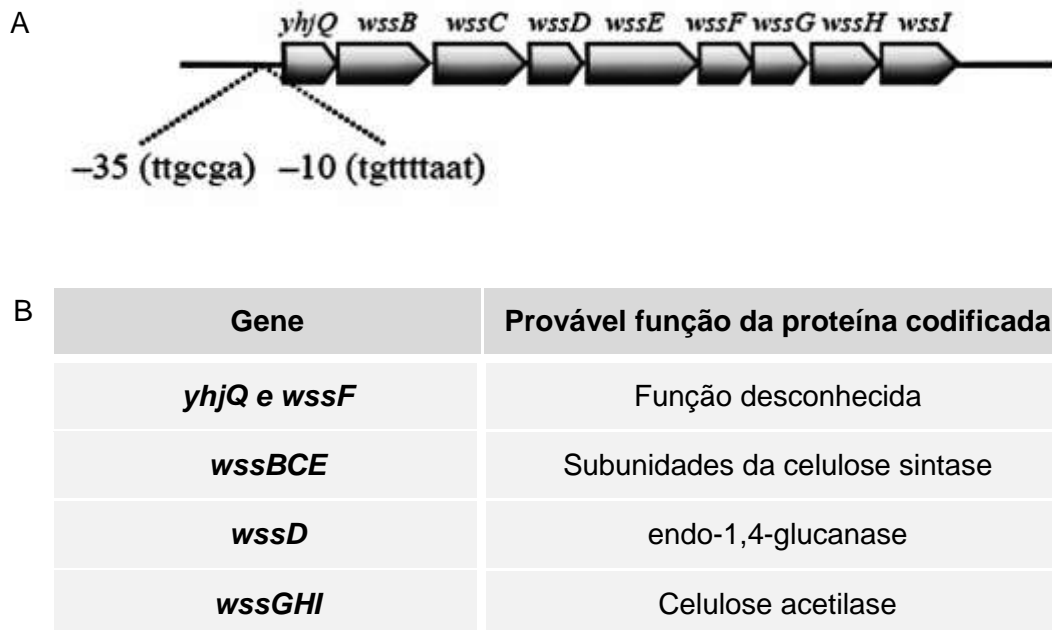


Figura 14 - Organização do cluster de biossíntese de celulose em *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. A presença do operon wss em *H.rubrisubalbicans* M1 foi identificada através da comparação *in silico* entre o genoma de *H. seropedicae* SmR1 e 2507 contigs de *H.rubrisubalbicans* M1. (A) A organização do cluster e (B) identificação dos genes foi feita através da comparação com o cluster wss de *Pseudomonas fluorescens* e *P. syringae* (SPIERS *et al.*, 2003)

6.3 Ensaio de adesão bacteriana a raiz de milho na presença da enzima celulase

Sabendo-se da importância da biossíntese de celulose na manutenção do padrão de adesão da bactéria às raízes de milho (MATHYSSE, 1981), foram realizados experimentos de contagem de bactérias aderidas após 30 minutos de inoculação com organismos previamente tratados com a enzima celulase. Este ensaio foi realizado com o objetivo de evidenciar se a produção deste exopolissacarídeo é importante já nos primeiros passos de interação planta-bactéria.

Como mostra a Figura 15, houve uma diminuição no número de bactérias aderidas à raiz de milho quando estas bactérias são previamente tratadas com 250µg/mL de celulase, em comparação com as bactérias não tratadas. Nota-se uma diminuição significativa no número de organismos aderidos após 30 minutos de inoculação, indicando a importância da biossíntese de celulose já nos primeiros momentos da interação planta-bactéria, apesar dos níveis de mRNA serem alterados significativamente somente após 3 dias de inoculação. Observa-se também uma diminuição no número de bactérias aderidas na estirpe SmR1 tratada com celulase; apesar desta estirpe não ser capaz de produzir celulose e da diferença não ser estatisticamente significativa, tal alteração pode se dar pela presença de outras glucanas secretadas como EPS pela estirpe SmR1.

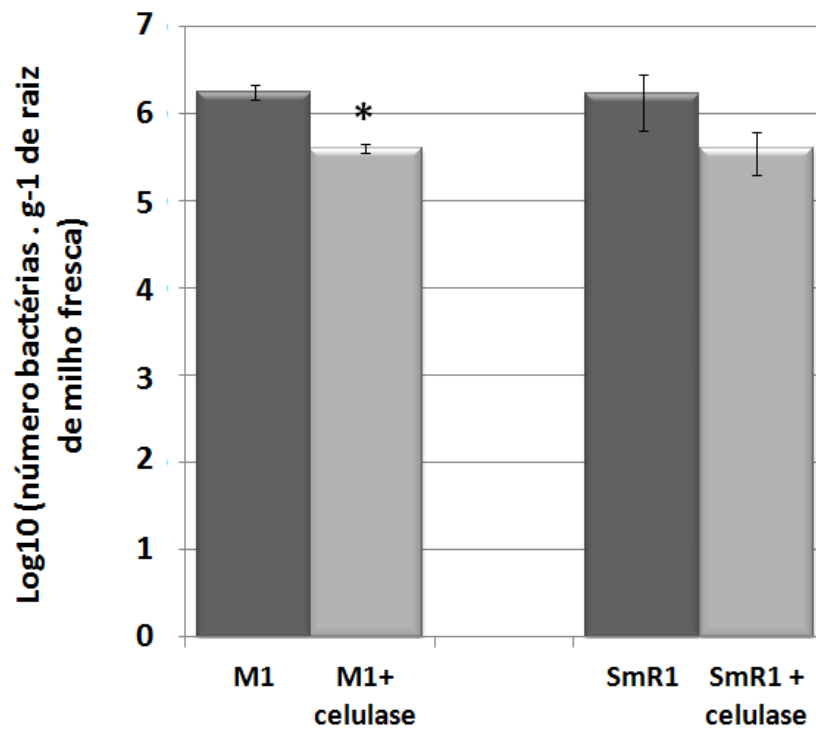


Figura 15 - Determinação do número de bactérias aderidas à raiz de milho, 30 minutos após a inoculação, na presença de celulase. As bactérias foram tratadas com 250µg/mL da enzima celulase, por 2 horas, em estufa 30°C. Após o tratamento, as células foram lavadas e inoculadas em plântulas de milho na concentração de 10^5 bactéria/plântula durante 30 minutos. Os controles foram submetidos ao mesmo procedimento, sendo adicionado apenas o tampão da enzima celulase. Após o tempo de inoculação, as bactérias aderidas foram recuperadas de acordo com o item 5.8.21. (*) indica diferença significativa entre as células tratadas com celulase e as células não tratadas com nível de significância de $p > 0.01$ (Teste T, programa Assistat).

Este ensaio na presença de celulase, indica a importância deste exopolissacarídeo no processo de interação planta bactéria durante o início da interação, nos mecanismos de adesão bacteriana a raiz das plântulas de milho.

6.4 Análises de PCR quantitativa para avaliação da expressão dos genes *wss*

Para confirmar a importância da biossíntese de celulose nos mecanismos de adesão planta bactéria, foram analisados os padrões de expressão do genes *wssBEF*. Realizamos experimentos de PCR quantitativa (qRT-PCR) crescendo o *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 em diferentes condições. Os genes *wssBEF* já são expressos quando a bactéria é crescida em meio NFbHP Malato suplementado com 20mM NH₄Cl (controle), essa expressão aumenta levemente em células recuperadas da superfície de milho 24 horas após a inoculação quando comparado com o controle. Após 72 horas de inoculação a expressão dos genes *wssBEF* aumentou 3 vezes em comparação com o controle. Na Figura 16 são mostrados os resultados da análise da expressão do gene *wssB*, o mesmo padrão de expressão foi encontrado para outros dois genes desse operon, *wssE* e *wssF*.

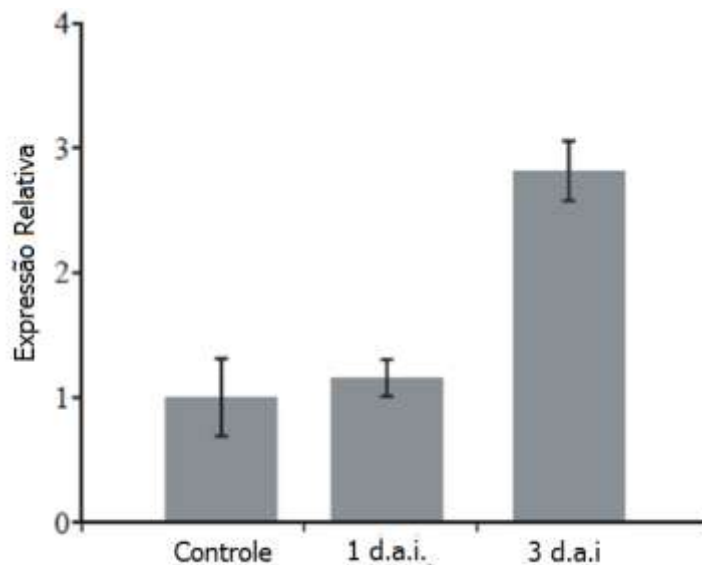


Figura 16 – Expressão do gene *wssB* em células de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 crescidas em meio líquido (controle) e aderidas a superfície de raízes e milho 1 e 3 dias após a inoculação. A expressão relativa foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*threshold cycle*) usando a expressão do rRNA 16S como controle. d.a.i., dias após a inoculação. 16S rRNA (R2 = 0,998, eficiência % = 98,157); *wssB* (R2 = 0,999, eficiência % = 95,086).

Estes resultados mostram que a biossíntese de celulose é importante para a manutenção das células de *H.rubrisubalbicans* aderidas a superfície de raízes de milho, confirmando os dados gerados pelos ensaios enzimáticos.

Sabendo da presença deste operon em *H.rubrisubalbicans* M1 e da sua ausência em *H. seropedicae* SmR1, e tendo em vista os dados preliminares gerados por análises de PCR em tempo real e análises enzimáticas, foi então, construída uma estirpe mutante no operon de biossíntese de celulose (*wss*) para análise fenotípica e determinação da importância deste mecanismo nos processos de Interação planta-bactéria.

6.5 Construção de organismos mutantes no gene *wssD* de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

Para a obtenção da estirpe mutante *wssD* foi construído o plasmídeo pHRT1.

Primeiramente uma região do gene *wssD* foi amplificada utilizando os *primers* (*wssD1* e *wssD2*) (TABELA 7). Para a reação de PCR foi usado gradiente de temperatura de 50 a 55°C e DMSO em todas as reações (Figura 17). A reação referente a temperatura de 55°C foi utilizada para os passos posteriores de clonagem.

TABELA 7 – PRIMERS UTILIZADOS NAS AMPLIFICAÇÕES DESTE TRABALHO

Primer	Sentido	Sítio de restrição	Sequência (5' > 3')	Aplicação	Referência
HR <i>wssD1</i>	F	Hind III	ATCCAGGGAAGCTTGGTGCC	Amplificar aproximadamente 500 pb do gene <i>wssD</i> de <i>H.rubrisubalbicans</i> .	Este trabalho
HR <i>wssD2</i>	R	Xho I	GAACAGCTCGAGATCGTTGGC		

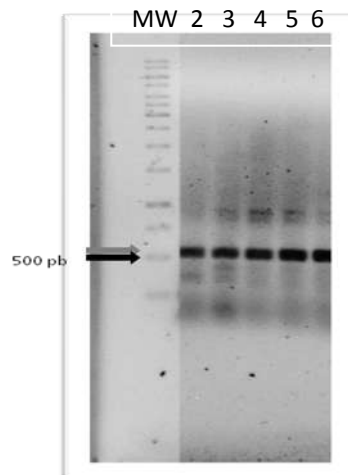
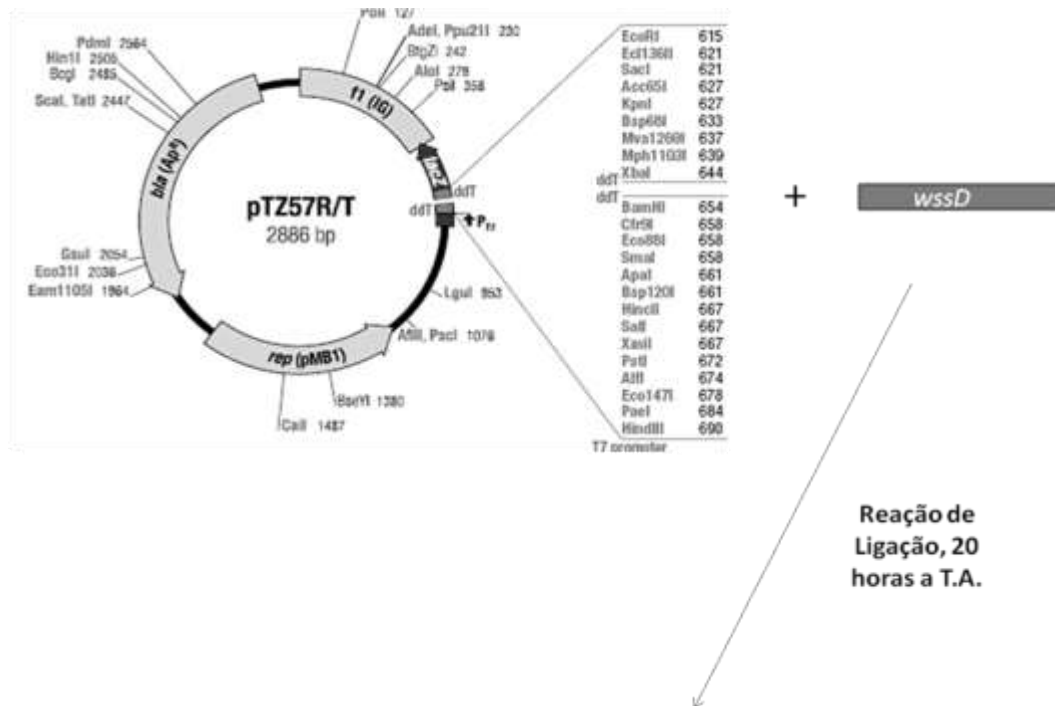


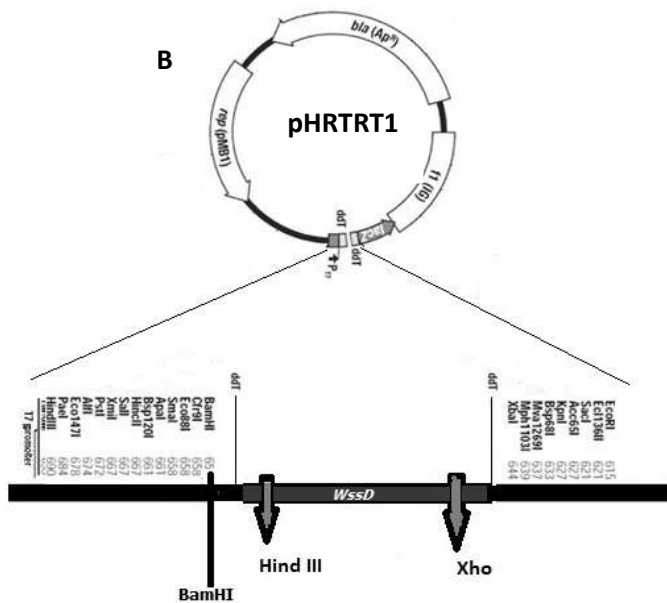
Figura 17 - Gel de eletroforese corado com Brometo de Etídeo evidenciando o produto da reação de PCR com os primers *wssD1* e 2. A seta preta indica o marcador de peso molecular 1kb na posição referente a banda de 500 pb; a seta cinza indica a posição do fragmento gerado após a reação de PCR, com pouco mais de 500 pb. Os poços de 2 a 6 representam as mesmas reações com variação da temperatura de 50; 52,5; 55; 57,5; e 60°C.

Após amplificação, o inserto foi clonado no vetor linearizado pTZ57R/T, gerando o plasmídeo pHRTRT1, que deve possuir o gene *lacZ* interrompido e possibilitar a seleção dos clones positivos. Os possíveis plasmídeos foram transformadas em *E. coli* Top10 e selecionados na presença de Ampicilina e X-Gal. Os possíveis clones tiveram seus plasmídeos purificados pelo método de lise alcalina e a confirmação da clonagem foi feita através das endonucleases de restrição, *EcoRI* e *BamHI*, gerando um fragmento de aproximadamente 500 pb, referente ao inserto inserido (Figura 18). Após obtenção do plasmídeo pHRTRT1, o cassete Km, retirado do vetor pUC4K através dos sítios *BamHI* foi clonados no plasmídeo pHRTRT1 através do sítio *BamHI* presente no vetor (Figura 19).

A



B



C

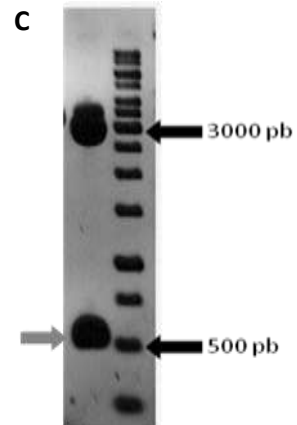


Figura 18 - Esquema de clonagem do inserto *wssD* no vetor pTZ57R/T (A), originando o plasmídeo pHRTRT1 (B) que foi transformado em *E. coli* Top 10. Após transformação, os clones positivos foram selecionados através do antibiótico ampicilina e X-Gal. (C) Gel de agarose 1%, tratado com Brometo de Etídeo, onde o poço 1 indica o produto da reação de restrição do plasmídeo pHRTRT1 com as enzimas BamHI e EcoRI confirmando a clonagem, sendo a seta cinza indicadora da banda referente ao fragmento de DNA do gene *wss*; o poço 2 mostra o marcador de peso molecular 1kb, as setas pretas indicam as bandas referentes a fragmentos de 500 e 3000 pb.

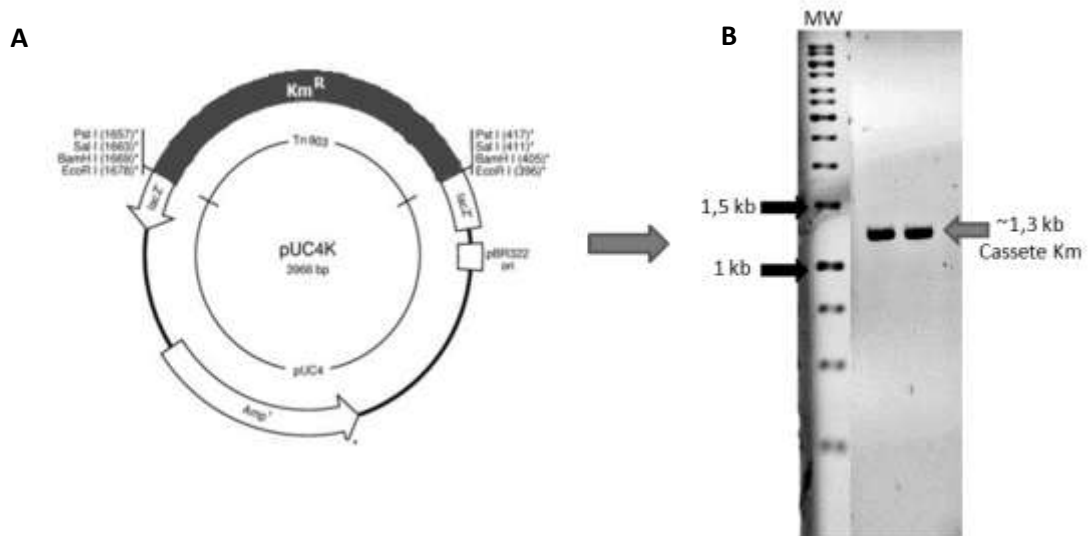


Figura 19 - Digestão do plasmídeo pUC4K para a obtenção do cassete Km. (A) Após a reação de restrição com a enzima BamHI, o banda do cassete Km foi purificada do gel e pode ser visualizada no gel de agarose 1% (B), corado com Brometo de etídeo. O marcador de peso molecular (MW) 1kb foi utilizado para comparação. As setas pretas indicam as bandas de 1 e 1,5 kb do marcador e a seta cinza indica o cassete Km purificado, com aproximadamente 1,3 kb em ambos os poços.

Os fragmentos do cassete Km mostradas na Figura 19 foram utilizados para clonagem no plasmídeo pHRTRT1, gerando o plasmídeo pHRTRT Km^R mostrado na Figura 20.

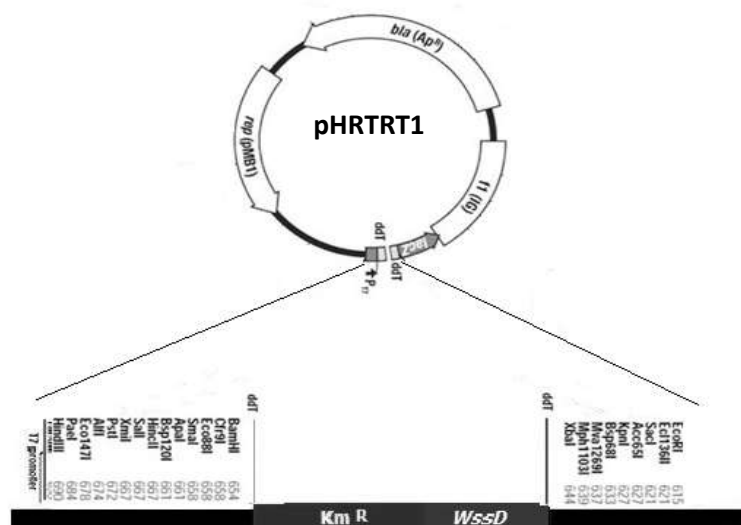


Figura 20 - Plasmídeo pHRTRT1 com o cassete Km inserido no sítios BamHI.

A confirmação da clonagem foi feita por PCR, utilizando os *primers* Universal e Reverso, que possuem sítios de anelamento no vetor. Na presença do cassete Km (1.3kb) e do inserto referente ao gene *wssD* de *H.rubrisubalbicans* (mais de 500pb) deve haver a amplificação de um fragmento entre 1.8 e 1.9 kb (Figura 21). A confirmação foi feita em 4 possíveis clones, em duplicata, e foi utilizado um controle negativo, onde o Mix da PCR não recebeu a Taq DNA polimerase, comprovando assim que as bandas observadas são produtos de PCR.

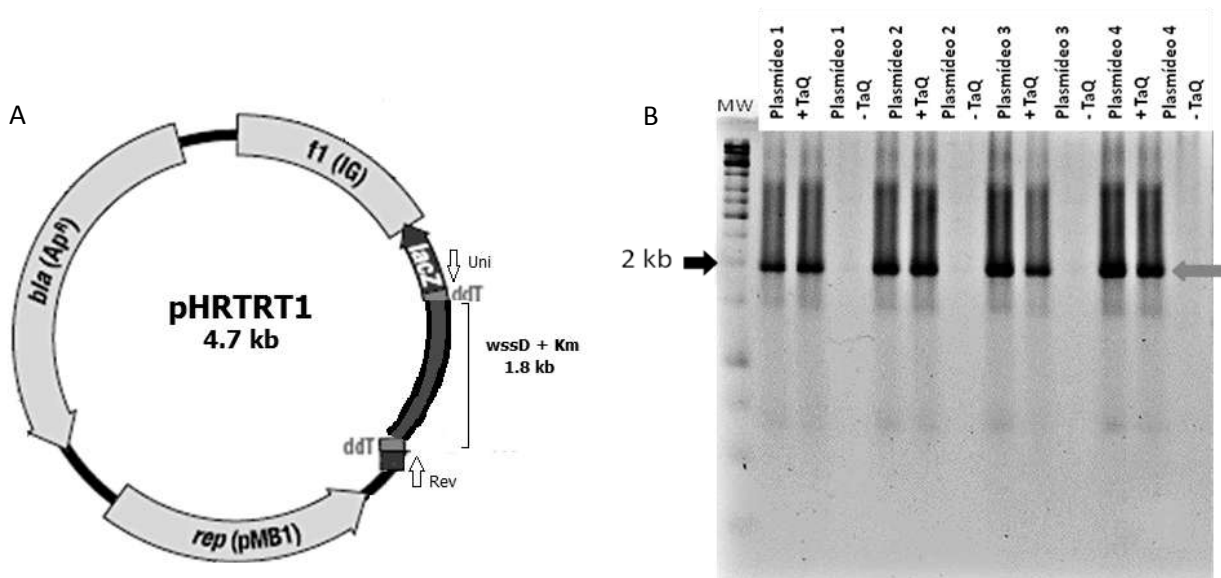


Figura 21 - Esquema do plasmídeo pHRTR1 Km^R (A), em (B) gel de agarose 1% em TBE, tratado com Brometo de Etídeo. A seta preta indica a banda do marcador de peso molecular (MW) correspondente a um fragmento de 2 kb e a seta cinza indica o produto da reação de PCR utilizando-se os primers Uni e Rev. Foram testados quatro possíveis clones, em duplicata, como indicado na figura. Como controle negativo foi feita uma reação sem Taq DNA polimerase para cada possível clone, evidenciando-se assim que as bandas observadas não são provenientes de excesso de template e sim são produtos de amplificação.

O plasmídeo 1 foi eletrotransformado na estirpe M1 de *H.rubrisubalbicans*. As células foram eletroporadas com 3 uL do plasmídeo purificado e plaqueadas em meio sólido NfbHP Malato com antibiótico Canamicina na concentração de 500 µg/mL.

Após a recombinação homóloga através da porção do gene *wssD*, o vetor foi inserido no genoma de *H.rubrisubalbicans* interrompendo a expressão do operon de biossíntese de celulose e gerando um mutante simples, chamado TRT1.

A confirmação do mutante foi feita por análises de PCR.

A estirpe selvagem M1 não apresentou produtos de amplificação com estes *primers* analisados. Em contrapartida, os organismos mutantes geraram um produto de PCR com o tamanho esperado. Desta forma, confirmou-se a entrada do vetor no DNA cromossomal de *H.rubrisubalbicans*.

Todas as estirpes bacterianas, selvagem e mutante, tiveram seu 16S sequenciado confirmando que se tratam da bactéria *H.rubrisubalbicans*.

6.6 Caracterização do crescimento bacteriano das estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*

Para verificar se a mutação no gene *wssD* alterou a taxa de crescimento da bactéria, nós comparamos as curvas de crescimento das estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*. O crescimento bacteriano foi acompanhado por 22 horas, tendo início no ponto 0, correspondente a D.O._{600nm} 0,01.

De acordo com a Figura 22, não foram observadas diferenças no crescimento entre as estirpes. A TABELA 8 mostra os dados de taxa de crescimento e tempo de geração indicando que a mutação do gene *wssD* não afeta a divisão celular.

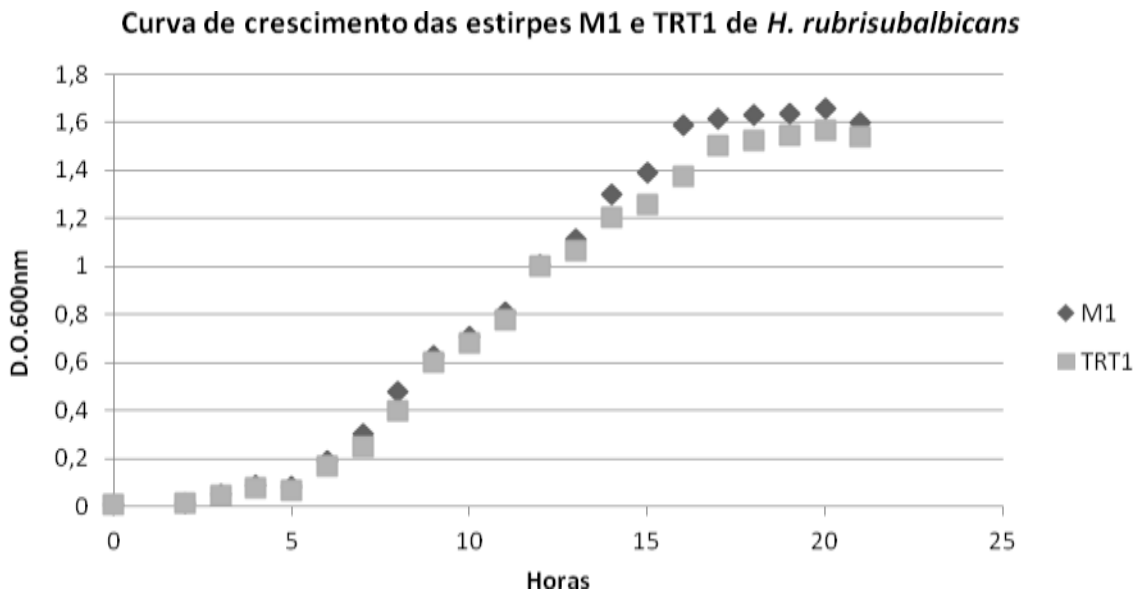


Figura 22 - Perfil de crescimento das estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*. O crescimento bacteriano foi acompanhado através da medição da densidade ótica em um comprimento de onda de 600nm. A medição foi feita a cada uma hora, durante 22 horas. O ponto zero corresponde ao primeiro ponto da curva com D.O.600 de 0,01. O gráfico demonstra o perfil de crescimento representativo de dois experimentos independentes.

TABELA 8: TAXA DE CRESCIMENTO E TEMPO DE GERAÇÃO DAS ESTIRPES M1 E TRT1 DE *H.rubrisubalbicans*

	M1	TRT1
Taxa de Crescimento	0,406	0,385
Tempo de Geração (h)	1,708	1,802

6.7 Ensaios de Coloração de celulose com Vermelho congo

Foram realizados ensaios utilizando o corante Vermelho congo, capaz de se ligar a glucanas $\beta(1 \rightarrow 4)$ presentes no meio extracelular. O vermelho congo foi adicionado ao meio NfbHP Malato semi-sólido corando as glucanas presentes na matriz extracelular da película formada no meio semi-sólido (Figura 23).



Figura 23 - Coloração com Vermelho congo evidenciando a menor produção de glucanas pela estirpe TRT em comparação com a estirpe M1.

O vermelho congo também foi adicionado ao meio líquido, as estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans* foram crescidas em meio líquido, sem agitação, na presença de 0,05% do corante vermelho congo por 48 horas (Figura 24 e a Figura 25).

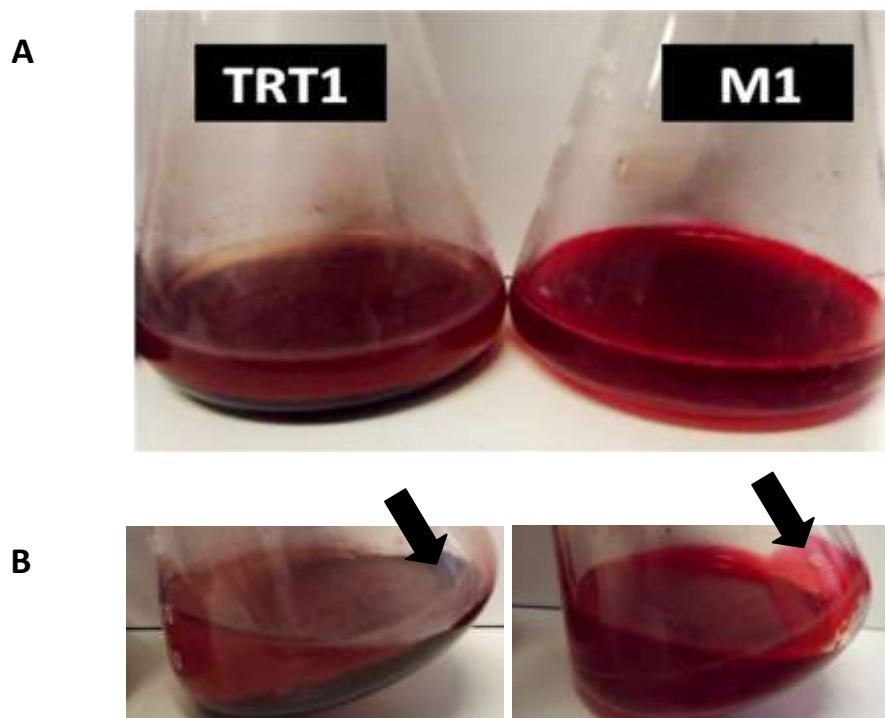


Figura 24 - Ensaio colorimétrico com o corante vermelho congo 0,005% em meio líquido, sem agitação. O ensaio foi feito em meio Nfb Malato líquido, sem agitação, por 48 horas. Nota-se em (A) que a película formada na interface entre ar-líquido é corada diferencialmente nas estirpes M1 e

TRT1 de *H.rubrisubalbicans*. Em (B) as flechas indicam a película ancorada na parede do erlenmeyer, evidenciando claramente a diferença de coloração e, portanto, a diferença na produção de glucanas entre as estirpes. Foram realizados 3 experimentos independentes em duplicata, as imagens são representativas dos dados obtidos.

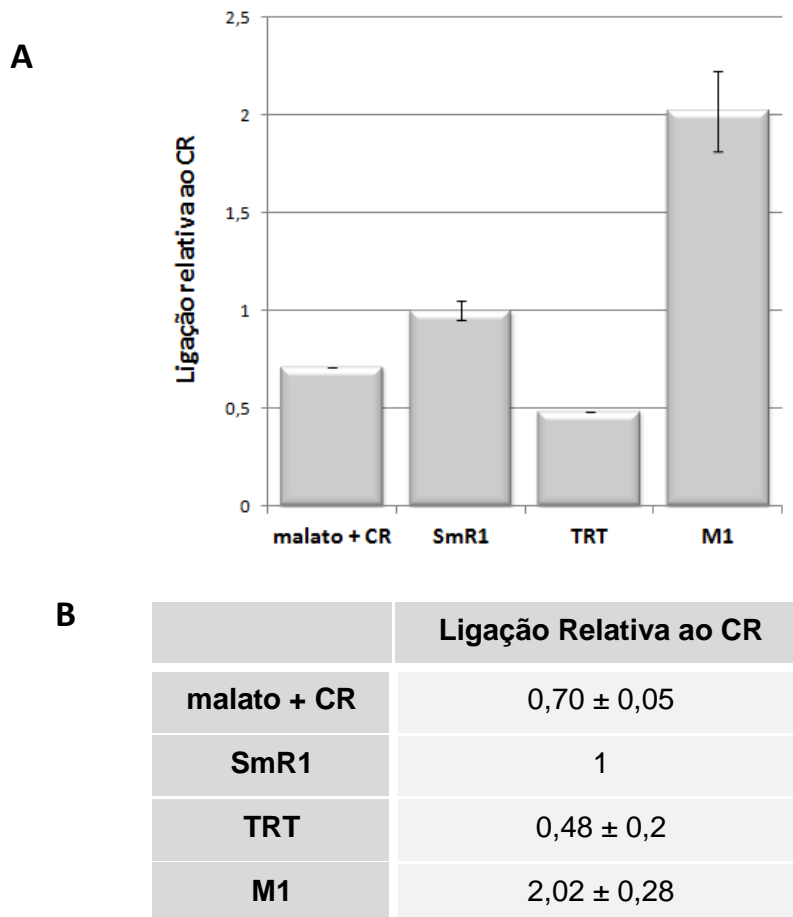


Figura 25 - Determinação da presença de EPS produzidos pelas estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans* através do ensaio de Ligação relativa ao Vermelho Congo (CR). Os ensaios foram realizados em meio Nfb malato líquido, por 48 horas, sem agitação. Em (A) estão os gráficos de Ligação relativa ao corante, onde foram utilizados o meio com o corante vermelho congo e a coloração da estirpe SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae* como controles negativos, já que esta estirpe não é capaz de produzir celulose. A estirpe SmR1 foi considerada com uma ligação relativa de 1 (um) para normalização dos dados. O ensaio foi realizado de acordo com SPIERS, A. J., *et al.*, 2003. Em (B) encontram-se os dados diretos da ligação relativa ao corante vermelho congo. Os resultados representam a média de 3 experimentos realizados em duplicata e há diferenças significativas com nível de significância de $p > 0.01$ entre todos os pontos analisados (teste t, Assistat)

As imagens da Figura 23 mostram uma diferença na formação da película bacteriana formada na interface ar-líquido. Nota-se que as películas formadas pelas estirpes M1 e TRT1 são coradas diferencialmente, indicando uma alteração na quantidade de glucanas produzidas por estas estirpes.

Os Resultados dos ensaios de coloração com vermelho congo indicam que há uma diferença significativa entre a quantidade de exopolissacarídeos produzidos pela estirpe M1 e pela estirpe TRT1 de *H.rubrisubalbicans*.

6.8 Formação de Biofilme em matriz inerte pela bactéria *H.rubrisubalbicans* estirpes M1 e TRT1

Devido a importância da celulose para a formação de biofilme e de agregados bacterianos (MATTHYSSE *et al.*, 1981) foram realizados ensaios de formação de biofilme em matriz inerte – lã de vidro – pelas estirpes M1 e TRT1 de *H. rubrisubalbicans*. (Figura 26).

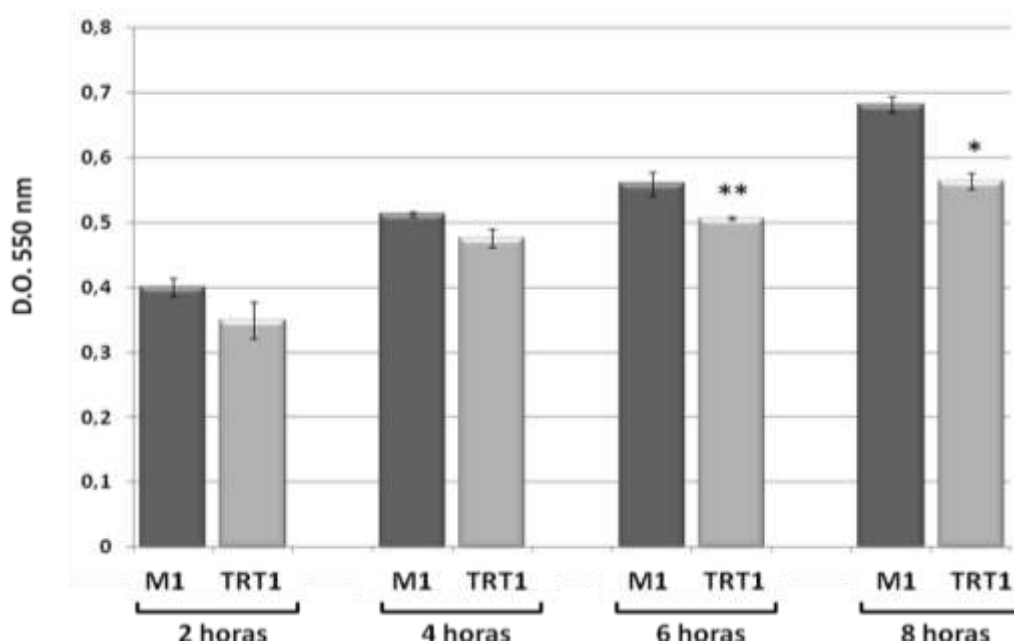


Figura 26 - Verificação de formação de biofilme em matriz inerte, através da coloração com violeta de genciana após 2, 4, 6 e 8 horas de inoculação. O ensaio foi realizado com as estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*. Os resultados representam a média de 3 ensaios independentes

feitos em duplicata. (*) Diferença significativa entre TRT1 e M1 com nível de significância de $p > 0.01$, (**) diferenças significativas entre TRT1 e M1 com nível de significância de $p > 0.05$ (Teste T, programa Assistat).

Os resultados apresentados nesse gráfico mostram uma diferença significativa entre a formação de biofilme nos pontos de 6 e 8 horas, indicando que a celulose parece ser importante para a formação de biofilme bacteriano.

O biofilme é uma forma de manter os microrganismos em um local específico por períodos suficientes para que se iniciem as interações benéficas ou antagônicas com a planta hospedeira (FUQUA, 2007), logo a deficiência na produção de celulose e a consequente diminuição na formação de biofilme sugerem que a celulose é importante para o processo de interação planta-bactéria.

6.9 Verificação da Formação de biofilme bacteriano em matriz inerte utilizando coloração com calcoflúor.

Nesse experimento foi utilizado calcoflúor para a verificação da formação de biofilme em lã de vidro após 24 horas de incubação. O calcoflúor é um corante que se liga a moléculas de glucanas ligadas $\beta(1 \rightarrow 4)$ e emite fluorescência quando excitado por luz UV. As bactérias foram crescidas em meio Nfb Malato na presença de 50mg de lã de vidro. Após o crescimento, a lã de vidro foi recuperada e corada com calcoflúor (Figura 27).

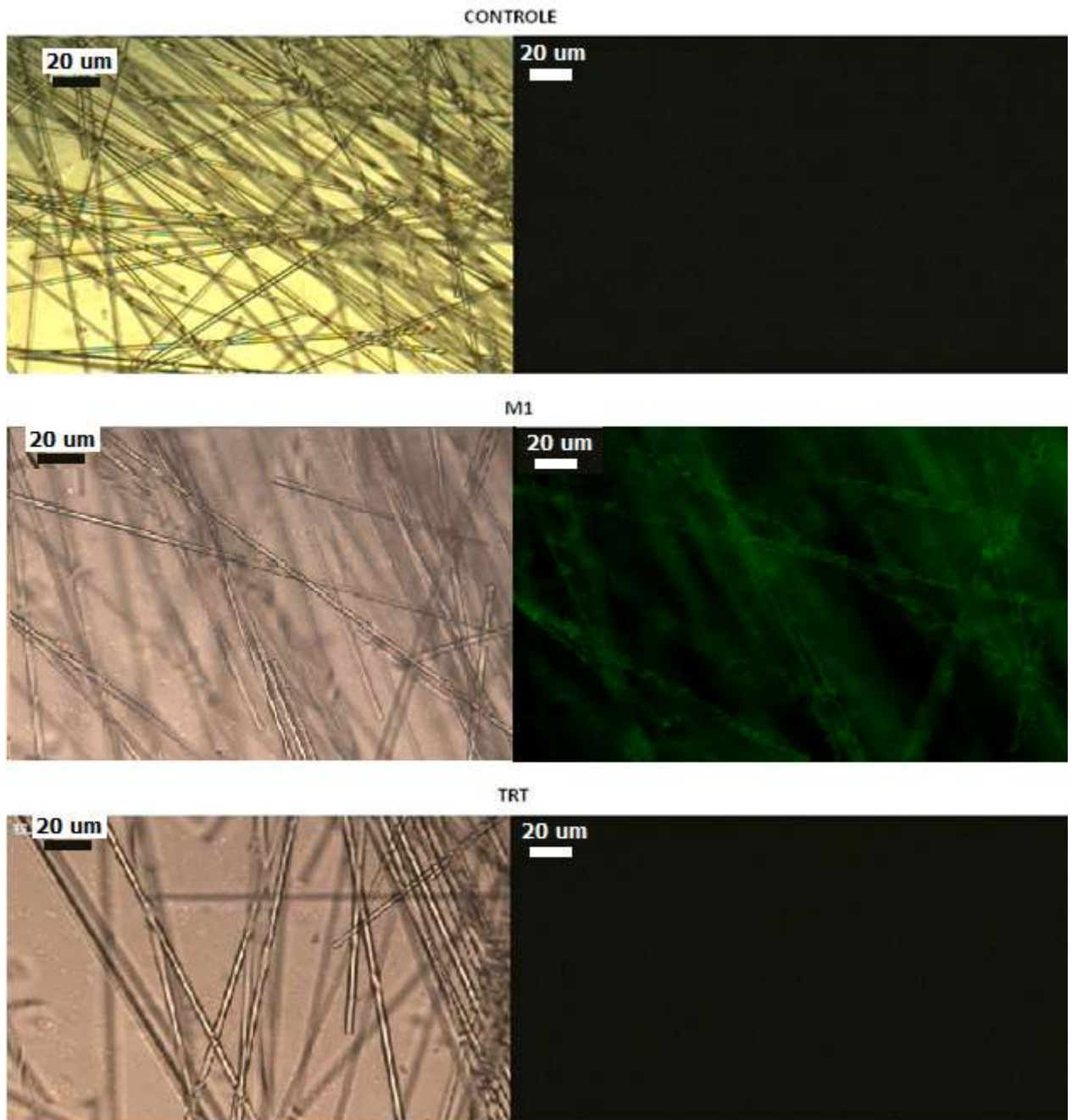


Figura 27 - Coloração do Biofilme com calcoflúor. Ensaio de microscopia de fluorescência em lâmina de vidro corada com calcoflúor evidenciando a presença de celulose apenas na estirpe M1 de *H.rubrisubalbicans*. As imagens da esquerda mostram microscopia de luz e as imagens da direita mostram a mesma região sob microscopia de fluorescência. As amostras foram observadas em microscópio Carl Zeiss – Jena, com objetiva de 25x, as imagens foram capturadas pela câmera AxioCam MRc e o software AxioVision L.E 4.6 foi utilizado para obtenção das imagens. Estas imagens são representativas de três ensaios independentes realizados nas mesmas condições.

Vários estudos mostram que a deficiência na produção de expolissacarídeos pode estar relacionada com alterações nos padrões de formação de biofilme. Estirpes de *V. cholerae* mutantes em genes relacionados a biossíntese de EPS são incapazes de formar agregados bacterianos e estruturas tridimensionais de biofilme (WATNICK e KOLTER, 1999). Os resultados obtidos neste experimento indicam que há uma diferença na quantidade de glucanas ligadas $\beta(1 \rightarrow 4)$ entre as estirpes TRT1 e M1 durante a formação de biofilme bacteriano. Estes dados corroboram diversos estudos que evidenciam a importância da biossíntese de polissacarídeos nos processos de agregamento bacteriano. Além disso, os dados nos levam a inferir que a estirpe TRT1 não é capaz de produzir celulose e que esta está diretamente envolvida com a produção de agregados bacterianos na estirpe M1 de *H.rubrisubalbicans*.

6.10 Ensaio de Motilidade das estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*

A motilidade é caracterizada por movimentos bacterianos em ambientes aquosos (“swimming”) ou ao longo de superfícies utilizando diferentes modos de translocação. Em alguns casos a motilidade em superfícies sólidas ou semi-sólidas é possível devido a excreção de moléculas bacterianas responsáveis por formar uma película fluida onde os microrganismos conseguem se movimentar (“swarming”) (HENRICHSEN, J. *et al.*, 1972; HARSHEY, R. M. *et al.*, 1994). Nestes casos as bactérias se traslocam através de flagelos. Em superfícies sólidas pode ocorrer o movimento de “twitching motility”; neste caso o movimento é dependente do pili do tipo IV (HENRICHSEN, J., *et al.*, 1983).

As várias formas de motilidade apresentadas pelas bactérias tornam-as capazes de estabelecer relações simbióticas e patogênicas com plantas (OTTEMANN e MILLER, 1997).

A motilidade pode trazer vários benefícios, como aumento da eficiência na aquisição de nutrientes, proteção contra substâncias tóxicas, habilidade de se traslocar para hospedeiros e acesso aos sítios de colonização preferenciais (RASHID E KORNBERG, 2000; WALL e KAISER, 1999)

Muitos trabalhos tem relacionado a formação de biofilme com a motilidade, essa relação se dá pela adesão a superfície e expansão sobre o substrato. Tal relação vem ganhando relevância nos estudos atuais sobre biofilme e motilidade (VERSTRAETEN *et al.*, 2003 e KOLTER *et al.* 2006)

Um trabalho realizado com uma biblioteca de mutantes de *Variovorax paradoxus* mostra que a maioria dos organismos mutantes que apresentam alterações na formação de biofilme, apresentam também alterações na motilidade; entre os organismos testados foram encontrados mutantes para genes de síntese de exopolissacarídeos, como *epsB* e *epsA* que são capazes de alterar o fenótipo padrão tanto de formação de biofilme quanto de motilidade em *V. Paradoxus* (PEHL *et al.*;2012).

Sabendo-se da alteração na formação de biofilme apresentada pelo mutante TRT1 de *H.rubrisubalbicans* foram realizados ensaios de motilidade com o objetivo de avaliar o possível envolvimento da síntese de EPS com os mecanismos de expansão e motilidade das estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans* (Figura 28).

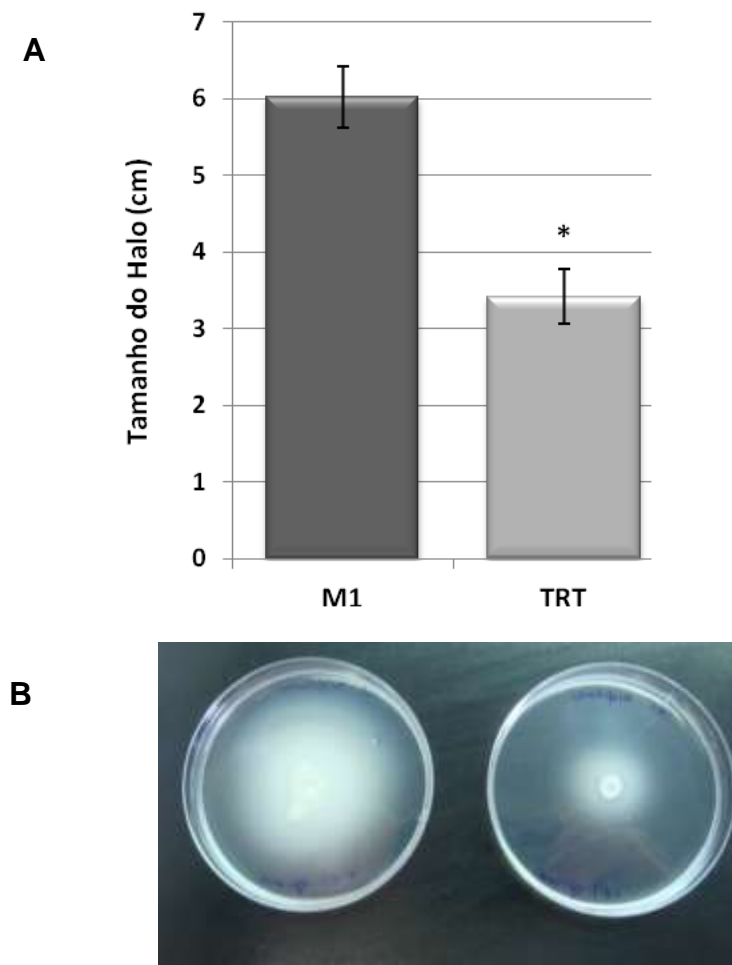


Figura 28 - Ensaio de Motilidade realizado com as estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*. O Ensaio foi realizado através da medição do halo formado pelo crescimento e motilidade das estirpes indicadas em meio Nfb Malato com 0,25% de ágar. (A) mostra o gráfico de comparação entre as estirpes M1 e TRT1 e em (B) uma imagem representativa do ensaio realizado para a geração destes dados. Os resultados representam a média de 4 ensaios independentes. (*) Diferença significativa entre TRT1 e M1 com nível de significância de $p > 0.01$ (Teste T, programa Assistat).

Assim como em outros organismos, os resultados mostram que a estirpe TRT1 teve a sua motilidade alterada quando comparada com a estirpe M1, sugerindo que a deficiência na produção de celulose altera a motilidade da bactéria tanto quanto a formação de biofilme.

6.11 Análise da Composição Monossacarídica dos Exopolissacarídeos produzidos pelas estirpes M1 e TRT 1 de *H.rubrisubalbicans* através de cromatografia gasosa

A análise de composição monossacarídica das amostras de EPS purificadas das estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans* foram feitas através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Esta análise teve o objetivo de avaliar possíveis alterações na composição dos exopolissacarídeos produzidos pelas estirpes estudadas (TABELA 9).

TABELA 9: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS AMOSTRAS DE EPS PURIFICADAS DAS ESTIRPES M1 E TRT1 DE *H.rubrisubalbicans*. OS DADOS SÃO MOSTRADOS EM FORMA DE PORCENTAGEM SOBRE O TOTAL DE CADA AMOSTRA.

	Ramnose	Fucose	Xilose	Manose	Galactose	Glucose
M1	5,69	5,26	8,69	14,72	39,40	26,22
TRT1	0,55	2,37	0,53	16,32	41,78	38,42

Os EPS foram extraídos do sobrenadante de culturas das estirpes M1 e TRT1 suplementadas com glucose. O rendimento da purificação de EPS foi similar e baixo, indicando que nessas condições de crescimento as duas estirpes produzem uma pequena quantidade de EPS. A análise da composição monossacarídica das amostras encontrou diferenças na composição dos exopolissacarídeos produzidos pelas estirpes M1 e TRT1. Nota-se que a estirpe TRT1 apresenta uma diminuição drástica na porcentagem de ramnose e xilose e um leve aumento na porcentagem de glucose quando comparada com a estirpe M1.

Sabendo-se que a quantidade de EPS obtida (2 miligramas) foi similar e que a composição destes EPS foi ligeiramente diferente, pode-se inferir que outros exopolissacarídeos estejam sendo sintetizados para compensar a ausência da biossíntese de celulose, já que foram observadas diferenças no padrão de formação biofilme e de composição dos polissacarídeos e não foram observadas diferenças na produção de EPS em quantidade (miligramas).

As amostras também foram analisadas por ressonância nuclear magnética. Mas devido ao baixo grau de rendimento e pureza das amostras não foram obtidos resultados satisfatórios.

6.12 Determinação da atividade celulolítica das estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*

Com o objetivo de determinar se as estirpes M1 e TRT1 possuem atividade celulolítica foram realizados ensaios de coloração com iodo de gram (Figura 29). A solução de iodo de gram é capaz de complexar com a carboximetilcelulose (CMC) adicionada ao meio de cultura, resultando na coloração escura; ao passo que é incapaz de se ligar a glucose, produto da degradação pelas enzimas celulolíticas, formando halos ao redor dos pontos de inoculação (KASANA, R. C., *et al.*, 2008).

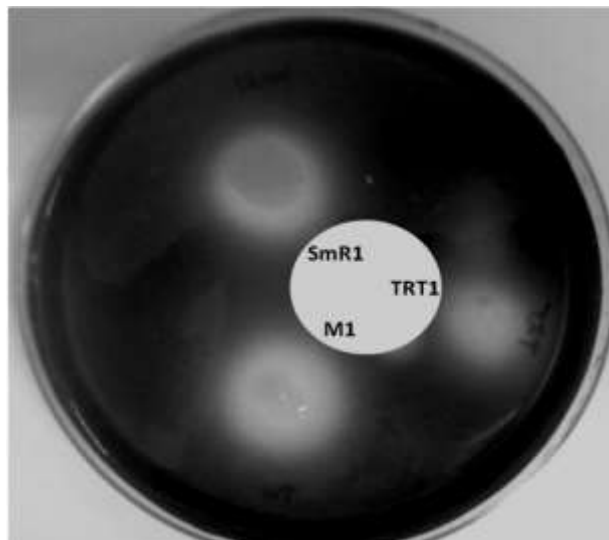


Figura 29 – Determinação da atividade celulolítica das estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*. As bactérias foram inoculadas em placas de meio LA, contendo 0,2% de carboximetilcelulose (CMC) e foram posteriormente coradas, por 5 minutos, com uma solução de iodo de gram para evidenciação dos halos oriundos da atividade celulolítica. Foram inoculadas as estirpes M1, TRT1 de *H.rubrisubalbicans* e a estirpe SmR1 de *H. seropedicae*. A estirpe SmR1 também possui celulases em seu genoma e foi utilizada como controle positivo. A imagem acima é representativa de 3 ensaios independentes.

A Figura 29 mostra a atividade celulolítica das estirpes M1, TRT1 e SmR1. Apesar de haver uma leve diferença no tamanho do halo formado entre as estirpes M1 e TRT1, não houve diferença significativa na atividade celulolítica entre as estirpes analisadas, mostrando que a mutação no operon de biossíntese de celulose não está relacionada diretamente com os mecanismos de degradação de celulose presentes na bactéria M1 *H.rubrisubalbicans*.

6.13 Ensaio de Interação planta bactéria realizados com a estirpe selvagem de *H.rubrisubalbicans* M1 e mutante TRT1.

Durante todo o processo de interação planta-bactéria já foi demonstrada a importância de diversas moléculas de polissacarídeos no ancoramento e na manutenção destes organismos no hospedeiro. Em *Rhizobium meliloti* os exopolissacarídeos são altamente requeridos para a formação de nódulos em leguminosas (LEIGH *et al.*, 1985).

Com o objetivo de verificar se a celulose está envolvida na colonização epifítica e endofítica de raízes de milho pelas estirpe M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans* foram realizados ensaios de adesão e colonização interna de raízes de milho.

A contagem de bactérias aderidas a raiz de milho foi feita após 1, 3 e 7 dias de inoculação (Figura 30)

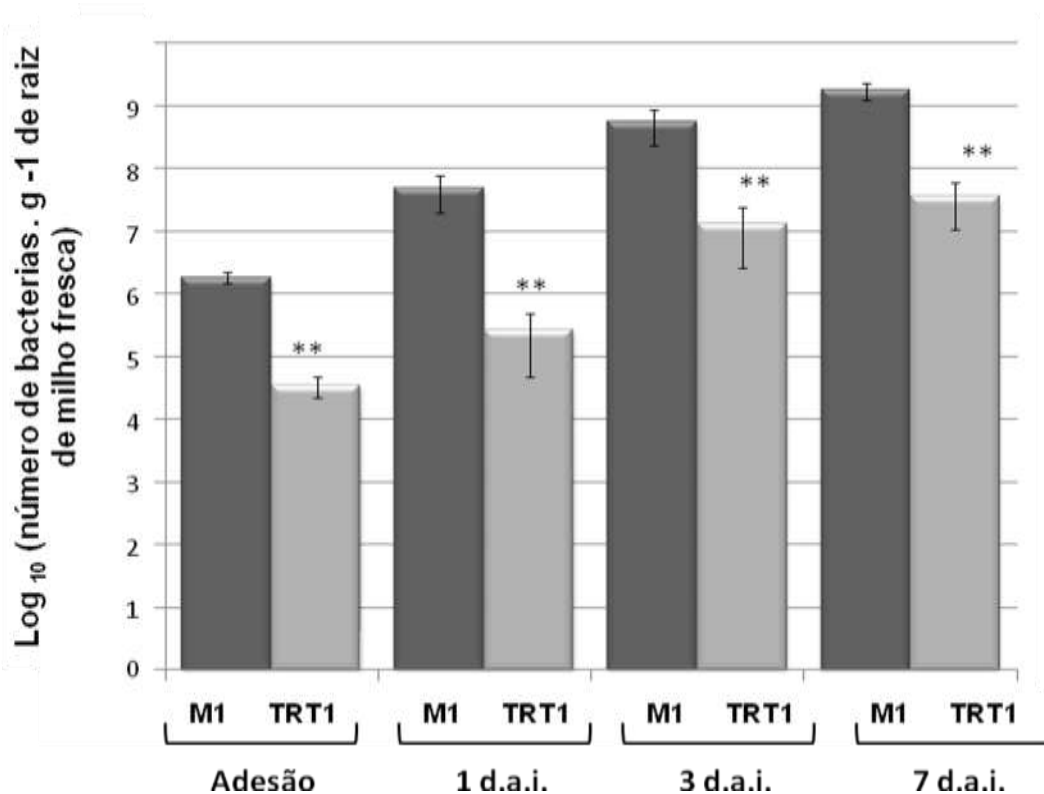


Figura 30 - Ensaio de Adesão realizado com as estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*. A contagem de bactérias epifíticas foi feita logo após a inoculação (Adesão) e 1, 3 e 7 dias após a inoculação (d.a.i.). As barras representam o desvio padrão observado nos experimentos. Os dados representam a média de, no mínimo, 3 ensaios distintos com 5 plantas em cada ensaio. (**) Há diferença significativa entre TRT1 e M1 com nível de significância de $p > 0.01$ (Teste T, programa Assistat)

A adesão da estirpe mutante TRT1 é cerca de 50 vezes menor quando comparado a estirpe selvagem M1. Ensaios realizados com *A. tumefacis* e *R. leguminosarum* mostraram a importância da celulose como agente ancorador da bactéria a superfície da raiz da planta garantindo uma adesão mais firme e eficiente (MATHYSSE *et al*, 1981 e AUSMEES *et al.*, 1999) . Os resultados obtidos com *H.rubrisubalbicans* M1 e TRT1 indicam que a celulose está envolvida no processo de interação planta bactéria e que é importante neste processo de adesão e ancoramento bacteriano a raiz da planta.

Foram realizados também ensaios de contagem de bactérias totais (epifíticas + endofíticas) (Figura 31) e bactérias endofíticas (Figura 32).

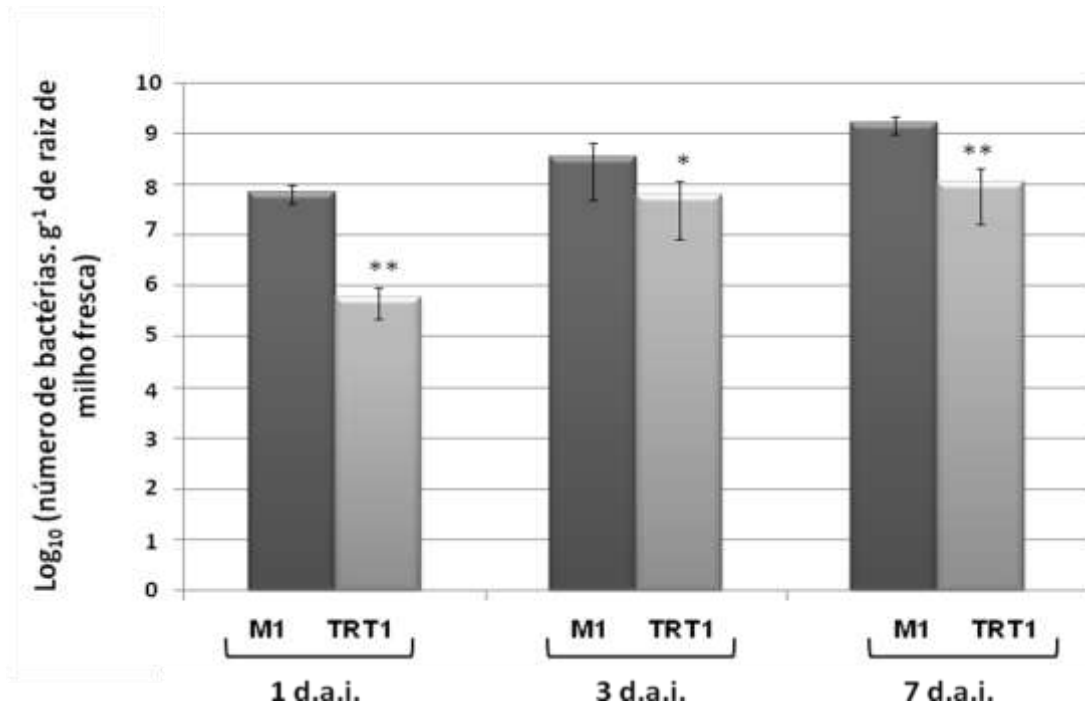


Figura 31 - Contagem de bactérias totais realizado com as estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*. A contagem das bactérias foi feita após 1, 3 e 7 dias de inoculação. As barras representam o desvio padrão observado nos experimentos. Os dados representam a média de, no mínimo, 3 ensaios distintos com 5 plantas em cada ensaio. (*) Diferença significativa entre TRT1 e M1 com nível de significância de $p>0.05$ (**) Diferença significativa entre TRT1 e M1 com nível de significância de $p>0.01$ (Teste T, programa Assistat)

De acordo com a contagem de bactérias totais mostrada na figura 31, há uma diferença significativa entre a contagem das estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans* em todos os dias analisados, mostrando mais uma vez o envolvimento da celulose nos processos de interação.

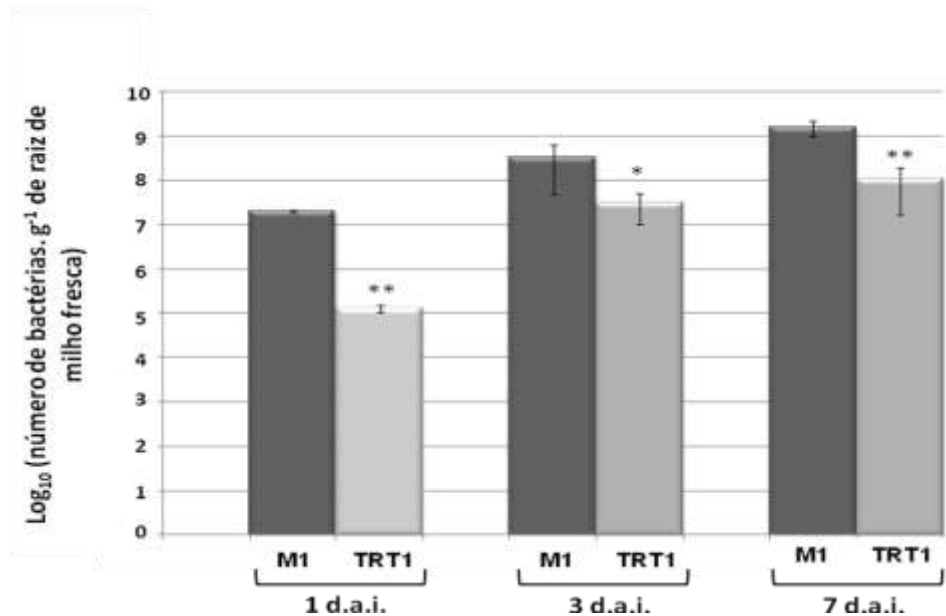


Figura 32 - Contagem de bactérias endofíticas de raízes de milho inoculados com as estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*. A contagem das bactérias foi feita após 1, 3 e 7 dias de inoculação (d.a.i.). As barras representam o desvio padrão observado nos experimentos. Os dados representam a média de, no mínimo, 3 ensaios distintos com 5 plantas em cada ensaio. (*) Diferença significativa entre TRT1 e M1 com nível de significância de $p>0.05$. (**) Diferença significativa entre TRT1 e M1 com nível de significância de $p>0.01$ (Teste T, programa Assistat).

A Figura 32 mostra a contagem de bactérias endofíticas após 1, 3 e 7 dias de inoculação. Nota-se uma diminuição significativa, de até 40 vezes, no número de bactérias endofíticas da estirpe TRT1 quando comparado com a estirpe M1.

Diversos estudos mostram a importância da biossíntese de EPS na interação planta-bactéria. Os EPS mais comuns são B-1,2 glucanas em *Rhizobiaceae* (HISAMATSU *et al.*, 1987), celulose em espécies de *Agrobacterium* (MATTHYSSE *et al.*, 1983) e *Rhizobium* (SMIT *et al.*, 1987) e alguns alginatos em espécies de *Pseudomonas* (FETT *et al.*, 1989).

Ensaio realizados com organismos mutantes para a produção de celulose de *Agrobacterium tumefaciens*, mostraram uma deficiência nos processos de adesão da bactéria a raiz de plantas (MATHYSSE, 19981) exatamente como é evidenciado nos ensaios realizados no Figura 30, com *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.

Os resultados encontrados nos ensaios de interação planta-bactéria corroboram estes estudos e evidenciam claramente a importância da biossíntese de

celulose nos processos de ancoramento e estabilização da bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 no hospedeiro, neste caso, plântulas de milho.

6.14 Determinação dos parâmetros de crescimento da planta de milho 7 dias após a inoculação com as estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*

Para avaliar a possível alteração dos parâmetros das plantas inoculadas com as estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*, foram realizados ensaios de medição do peso fresco, peso seco, comprimento da raiz e da parte aérea e número de raízes após 7 dias de inoculação em plantas de milho (Figura 33 e Figura 34).

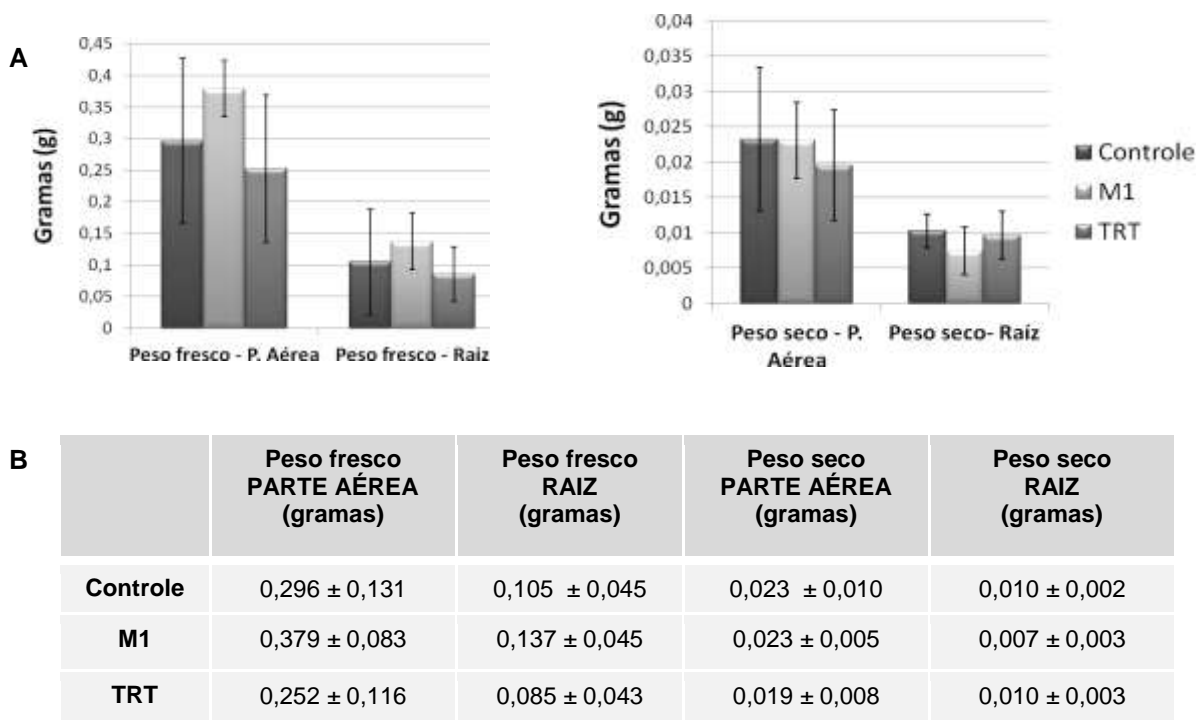
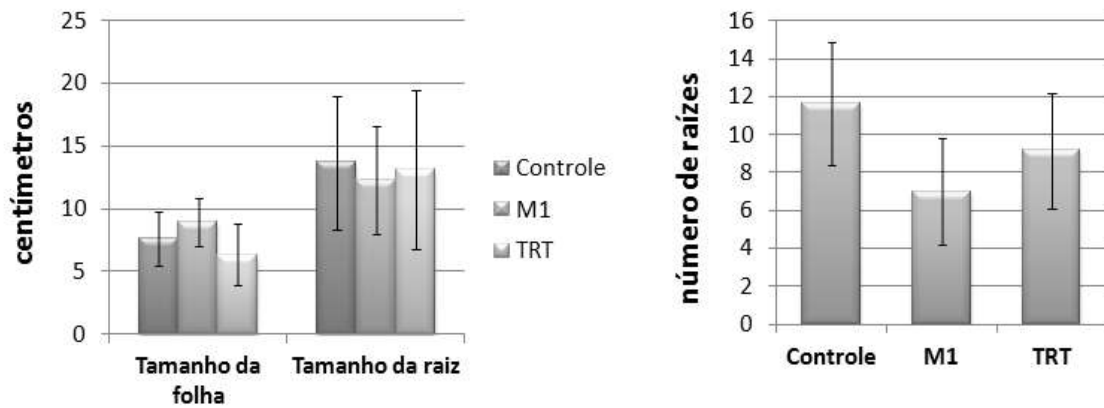


Figura 33 - Ensaio de medição do Peso seco e do Peso Fresco de plantas de milho inoculadas com M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans* após 7 dias de inoculação. Em (A) a representação gráfica dos resultados obtidos. As barras de erros representam o desvio padrão encontrado em 3 experimentos independentes feitos com 10 plantas cada. A TABELA (B) mostra os resultados das medições realizadas.



	Tamanho da PARTE AÉREA (cm)	Tamanho da RAIZ (cm)	Número de Raízes
Controle	7,62 ± 2,19	13,70 ± 5,29	11,67 ± 3,24
M1	8,95 ± 1,97	12,26 ± 4,32	7,00 ± 2,77
TRT	6,37 ± 2,47	13,15 ± 6,34	9,14 ± 3,02

Figura 34 - Ensaio de medição do comprimento da parte aérea e da raiz e a contagem do número de raízes adventícias de plantas de milho inoculadas com M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans* após 7 dias de inoculação. Em (A) a representação gráfica dos resultados obtidos. As barras de erros representam o desvio padrão encontrado em 3 experimentos independentes feitos com 10 plantas cada. A TABELA (B) mostra os resultados das medições realizadas

Os resultados mostrados na figura 33 e 34 indicam que não houve diferenças significativas entre o crescimento das plantas controle e das plantas inoculadas com M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*.

6.15 Ensaios de Patogenicidade com plantas de Cana-de-açúcar B-4362

Em algumas bactérias patogênicas para vegetais, como *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, a deficiência na produção de EPS provocou uma alteração no padrão de infecção e de manifestação de sintomas (QUINONES *et al.*, 2005). Com o objetivo de saber se a celulose está relacionada com os mecanismos de desenvolvimento de doenças, foram realizados ensaios de patogenicidade na variedade B-4362 de cana-de-açúcar. As plantas com aproximadamente 70 dias foram inoculadas com 10^8 bactéria e acompanhadas durante 30 dias. Após 20 dias foram observados sintomas de doença nos dois casos analisados (Figura 35).

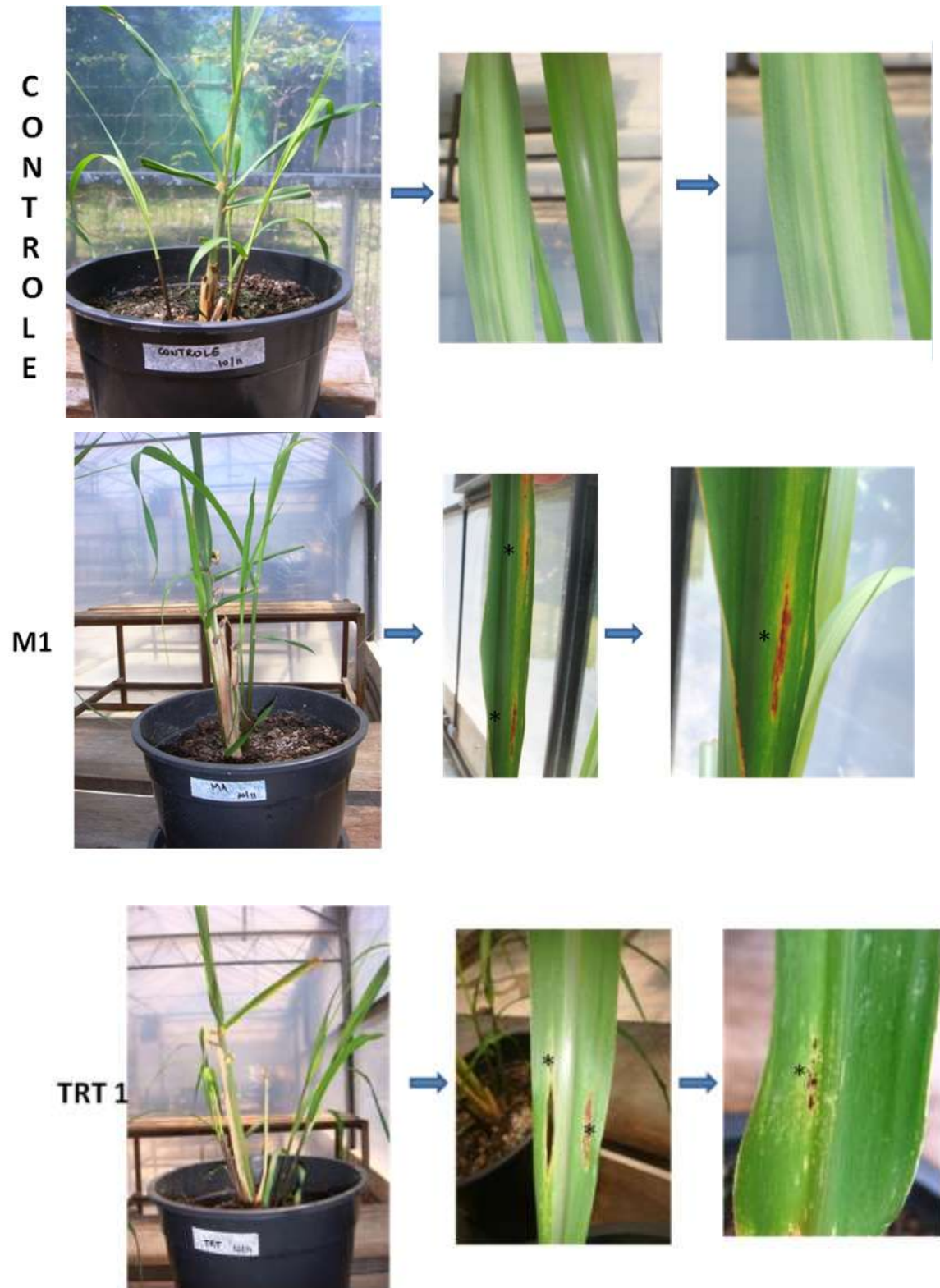


Figura 35 - Ensaio de patogenicidade realizado com plantas de Cana de açúcar B-4362 inoculadas com M1 e TRT de *H.rubrisubalbicans*. Os (*) indicam pontos de lesão da doença da estria vermelha. As imagens são representativas de 4 plantas testadas para cada condição.

De acordo com os dados do experimento de patogenicidade, apesar da biossíntese de celulose ser importante nos processos de Adesão e Colonização Interna ela não parece ser decisiva para o desenvolvimento da doença da estria mosqueada na variedade B-4362 de Cana-de-açúcar. Em *H.rubrisubalbicans*, apesar de haver alteração na produção de biofilme e nos ensaios de contagens de bactérias em plantas, não houve alteração do fenótipo de patogenicidade nas condições analisadas.

6.16 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram realizados ensaios de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o objetivo de avaliar possíveis alterações no padrão de formação da película de biofilme entre as estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans* (Figura 36).

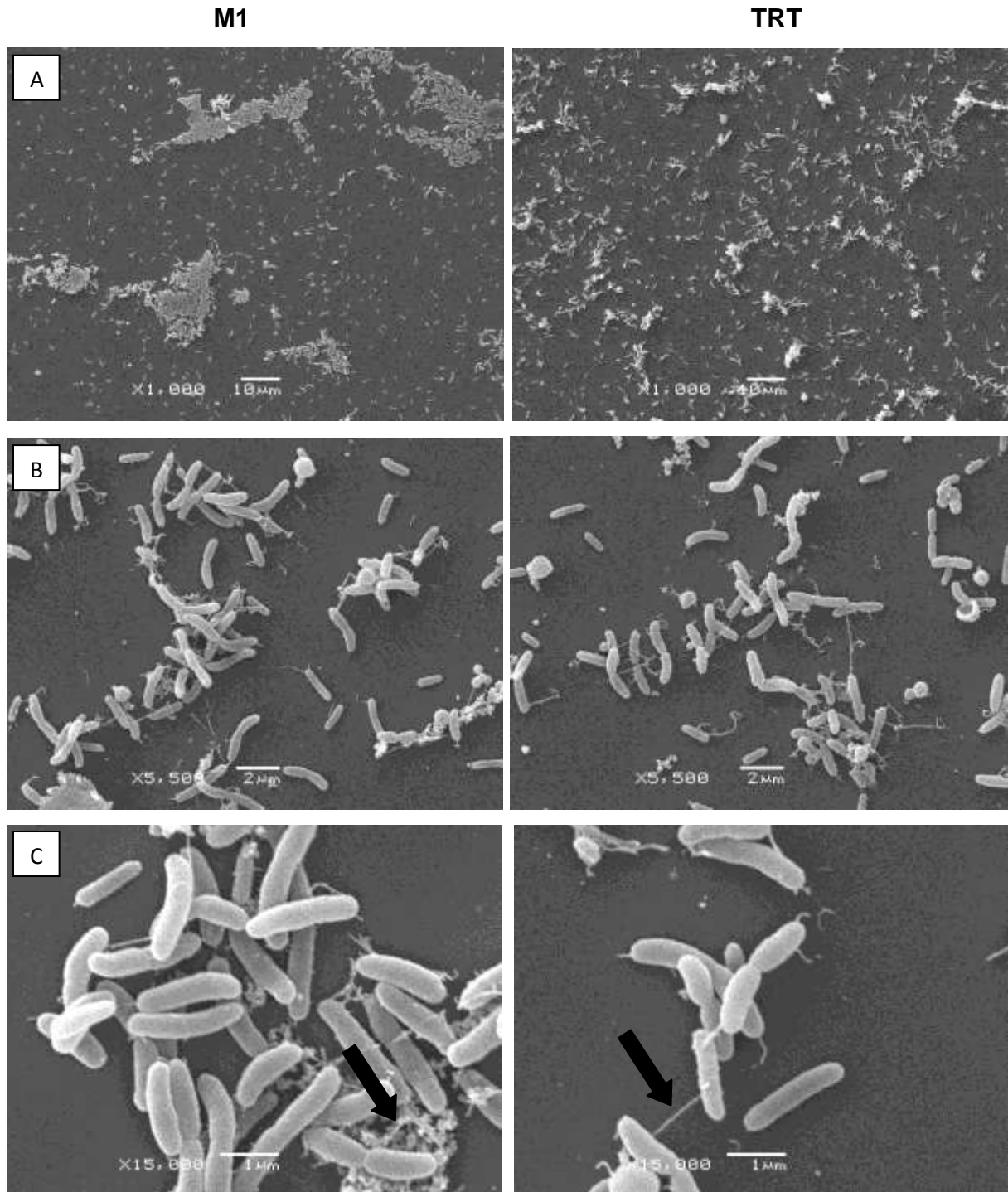


Figura 36 – Microscopia Eletrônica de Varredura das estirpes M1 e TRT 1 de *H.rubrisubalbicans*. As bactérias foram crescidas em placas de petri contendo meio líquido e lamínulas de 1 cm de diâmetro. As lamínulas recuperadas após 72 horas foram observadas e as imagens mostram a película bacteriana formada sobre a lamínula. As imagens foram feitas em microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV do Centro de Microscopia Eletrônica – Universidade Federal do Paraná. O aumento utilizado e as escalas estão indicados nas micrografias. Em (C) as setas indicam a diferença na disposição das fibrilas observadas nos agregados bacterianos.

Durante a realização do ensaio foram obtidas películas nas duas estirpes analisadas, sendo que a película formada pela estirpe TRT1 era mais frágil e facilmente removida. De acordo com as imagens observadas na figura 38A, nota-se que o biofilme formado pela estirpe M1 parece ser mais compacto quando comparado com o mesmo biofilme da estirpe TRT1. A estirpe M1 apresenta grandes agregados bacterianos, enquanto a estirpe TRT1 apresenta agregados menores e mais espaçados. Em todas as imagens são observadas pequenas fibrilas, características de fibras de polissacarídeos (Figura 38B).

Apesar de serem observadas fibrilas nas duas estirpes, os agregados bacterianos formados pela estirpe M1 se apresentam maiores e mais compactos e os agregados de fibrilas indicados pelas setas nas imagens estão presentes em alta quantidade na estirpe M1, o que não ocorre na estirpe TRT1.

Diante destes resultados, podemos concluir que a mutação no gene *wssD* leva a alterações no padrão de formação da película bacteriana através da alteração do padrão de fibrilas, como indicado pelas setas na Figura 38C. Estas alterações, apesar de não serem contundentes, levam a formação de agregados bacterianos menores e conseqüente alteração na formação de biofilme bacteriano.

6.17 Ensaio de Competição entre as estirpes M1 e TRT1 de *H.rubrisubalbicans*

Foram realizados ensaios de competição entre as estirpes analisadas neste trabalho com o objetivo de avaliar possíveis vantagens competitivas relacionadas a produção de celulose. No Figura 37 é mostrado um ensaio de adesão e competição entre as estirpes estudadas. A diferenciação das estirpes foi realizada utilizando-se os antibióticos adequados.

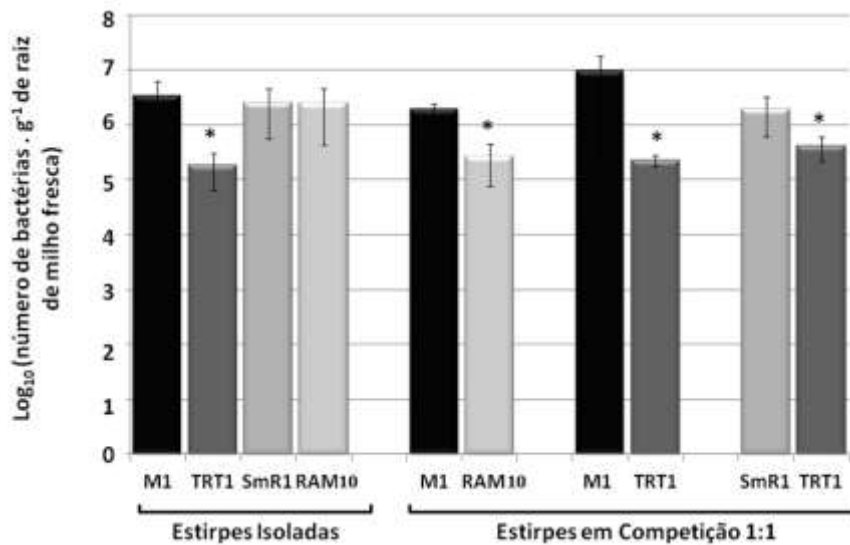


Figura 37 – Ensaio de Adesão e Competição entre as estirpes M1, TRT1 de *H.rubrisubalbicans* e a estirpe SmR1 de *H. seropedicae*. A contagem das bactérias foi feita após a inoculação. As barras representam o desvio padrão observado nos experimentos. Os dados representam a média de, no mínimo, 3 ensaios distintos com 5 plantas em cada ensaio. (*) Diferença significativa entre TRT1 e M1 com nível de significância de $p > 0.01$ (Teste T, programa Assistat).

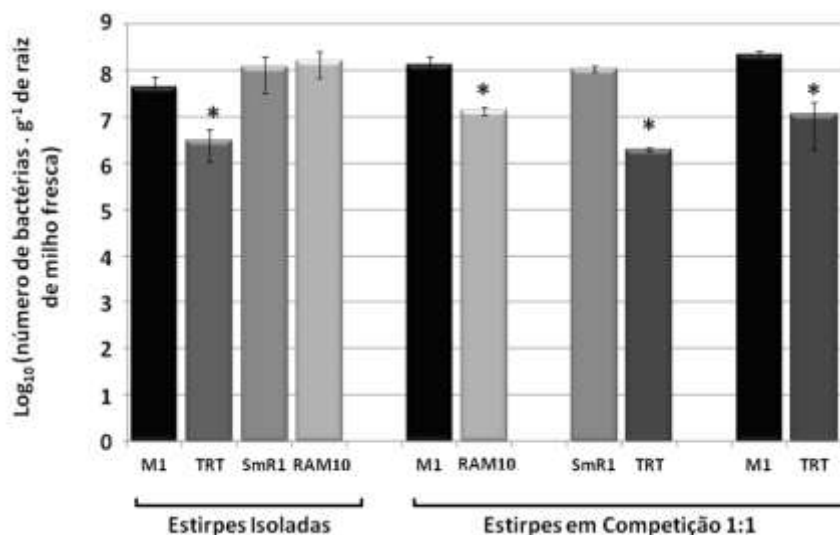


Figura 38 – Ensaio de Competição epifítica entre as estirpes M1, TRT1 de *H.rubrisubalbicans* e as estirpes RAM10 e SmR1 de *H. seropedicae* 1 dia após a inoculação. A contagem das bactérias epifíticas foi feita um dia após a inoculação. As barras representam o desvio padrão observado nos experimentos. Os dados representam a média de, no mínimo, 3 ensaios distintos com 5 plantas em cada ensaio. (*) Diferença significativa entre TRT1 e M1 com nível de significância de $p > 0.01$ (Teste T, programa Assistat).

Os resultados apresentados nas figuras 37 e 38 mostram uma diminuição no número de bactérias da estirpe RAM10 de *H. seropedicae* (estirpe SmR1 marcada com GFP, proteína verde fluorescente, e resistente a Canamicina) aderidas e colonizando epifiticamente raízes de milho quando esta é co-inoculada com a estirpe M1 de *H.rubrisubalbicans*. Essa diferença continua sendo observada mesmo quando co-inoculamos a estirpe RAM10 numa proporção de 10:1 com M1 (figura 39). Os resultados obtidos sugerem que a estirpe M1 *H.rubrisubalbicans* possui uma vantagem sobre a estirpe RAM10.

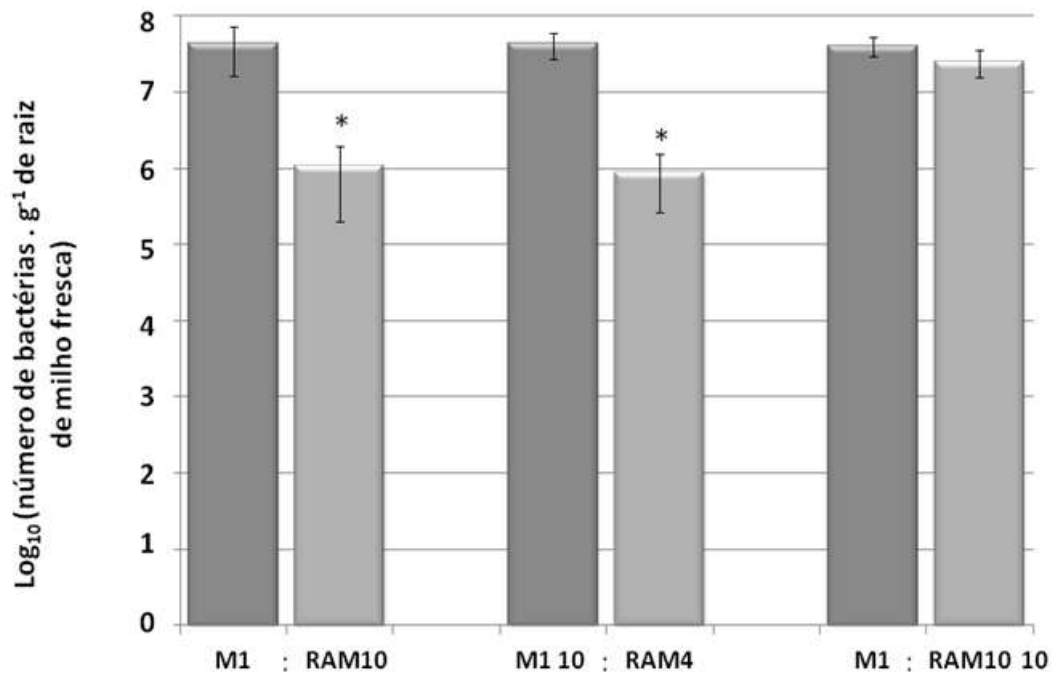


Figura 39 – Ensaio de Adesão em Competição com as estirpes M1 e RAM10 de *H. seropedicae* nas proporções 1:1, 1:10 e 10:1. O ensaio de Competição foi realizado 30 minutos após a inoculação. A estirpe RAM10 foi utilizada para representar a estirpe SmR1, já que possui um cassete de resistência ao antibiótico Canamicina, possibilitando a diferenciação das estirpes bacterianas. As barras representam o desvio padrão observado nos experimentos. Os dados representam a média de, no mínimo, 3 ensaios distintos com 5 plantas em cada ensaio. (*) Diferença significativa entre TRT1 e M1 com nível de significância de $p > 0.01$ (Teste T, programa Assisat).

Porém essa diferença de adesão e colonização epifítica das estirpes de *H. seropedicae* não ocorre quando esta é co-inoculada com a estirpe mutante TRT1, Esses resultados indicam que a vantagem competitiva da estirpe M1 sobre o *H. seropedicae* não ocorre quando o gene *wssD* é mutado, sugerindo que a celulose está envolvida nesse processo.

7. CONCLUSÕES

- As comparações genômicas entre as estirpes SmR1 de *H. seropedicae* e M1 de *H. rubrisubalbicans* mostraram vários genes espécie específicos possivelmente relacionados aos processos de interação planta bactéria, entre eles, proteínas efetoras do Sistema de Secreção do Tipo III e um cluster de genes relacionados com a biossíntese de celulose.

- A expressão dos genes do operon *wss* é aumentada durante a adesão com as raízes de milho, indicando o envolvimento deste operon na interação de *H. rubrisubalbicans* com raízes de milho. .

- A mutação no gene *wssD* afetou a produção de EPS pela estirpe mutante TRT1 de *H. rubrisubalbicans*, sugerindo que pode ter ocorrido a diminuição da síntese de celulose.

- A mutação no gene *wssD* alterou a produção de biofilme e a motilidade da estirpe mutante TRT1 de *H. rubrisubalbicans*, indicando que a biossíntese de celulose pode ser importante para esses dois processos.

- A mutação no operon *wss*, apesar de ser importante para a interação planta bactéria, não é essencial para o desenvolvimento da doença da estria mosqueada na variedade B4362 de cana-de-aúcar.

- A mutação no gene *wssD* afetou a adesão, a colonização epifítica e endofítica de raízes de milho pela bactéria *H. rubrisubalbicans* TRT1. Esses resultados mostram que a biossíntese de celulose é importante para a interação entre *H. rubrisubalbicans* e o milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J.; Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. 215:403–410. 1990.
- ASSMUS, B.; HUTZLER, P.; KIRCHHOF, G.; AMANN, R.; LAWRENCE J. R.; HARTMANN, A.; In Situ Localization of *Azospirillum brasilense* in the Rhizosphere of Wheat with Fluorescently Labeled, rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes and Scanning Confocal Laser Microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**. vol. 61 no. 3 1013-1019. 1995.
- AUSMEES, N., JONSSON, H., HOGLUND, S., LJUNGGREN, H. AND LINDBERG, M. Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. **Microbiology** 145:1253-1262. 1999.
- BAIS, H.P., WEIR, T. L., PERRY, L. G., GILROY, S., VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annu. Rev. Plant Biology**. 57, 233–266; 2006.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**. V. 36. P. 86-93. 1986.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65-73, 1992.
- BALDANI B., POT G., KIRCHHOF E., FALSEN V. L. D., BALDANI F. L., OLIVARES, B. HOSTE, K. KERSTERS, A. HARTMANN, M. GILLIS, J. DÖBEREINER. Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. **Int J Syst Bacteriol**, v. 46, p.802- 810, 1996.
- BALSANELLI, EDUARDO; Análise Genômica Comparativa do Sistema de Secreção do Tipo III de Endófitos do Gênero *Herbaspirillum*. **Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da UFPR**, sob orientação dos professores Emanuel Maltempi de Souza e Rose Adele Monteiro, 2007.

BALSANELLI, E., SERRATO, R. V., BAURA, V. A., SASSAKI, G., YATES, M. G., UN RIGO, L., PEDROSA, F. O., SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A.; *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology** 12(8), 2233–2244, 2010.

BRANDL, M. T.; CARTER, M. Q.; PARKER, C. T.; CHAPMAN, M.R.; HUYNH, S.; ZHOU, Y.; Salmonella biofilm formation on *Aspergillus niger* involves cellulose – chitin Interactions. **PLoS ONE**, 6(10): e25553, 2011.

CHAVEZ-PACHECO, J. L.; MARTÍNEZ-YEE, S.; CONTRERAS ZENTELLA, M.; MARVÁN, E. E.; Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: Biosíntesis y aplicaciones. TIP- **Revista especializada em Ciências Químico-biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México**. 7; 26; 2004.

CHRISTOPHER, W. N.; EDGERTON, C. W. Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. **Journal Agriculture Reserch**. v. 41, p. 259, 1992.

CIANCIOTTO, N. P. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. **Trends Microbiology**.;13(12):581-8. Epub 2005.

COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J. Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products. Ed. John Wiley & Sons, p. 463-524, 1995.

CONRATH, U., BECKERS, G. J. M., FLORS, V., GARCÍA-AGUSTÍN, P., JAKAB, G., MAUCH, F., NEWMAN, M., PIETERSE, C. M. J., POINSSOT, B., POZO, P., PUGIN, A., SCHAFFRATH, U., TON, J., WENDEHENNE, D., ZIMMERLI, L., MAUCH-MANI, B. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant Microbe Interactions**; 19, 1062–1071; 2006.

COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R., AND LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Rev. Microbiology**; 49: 711±745. 1995.

CORNELIS G. R.; van GIJSEGEM F. Assembly and function of type III secretory systems. **Annu. Rev. Microbiology**.; 54:735-74, 2000.

CORNELIS, G. R. The type III secretion injectisome, **Nature**, vol. 2, p. 811-825, 2006.

CROES, C. L., MOENS, S., VANBASTELAERE, E., VANDERLEYDEN, J., MICHIELS, K. W. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. **J. Gen. Microbiol.** 139:2261–69, 1993.

DAVIES, D. G., M. R. PARSEK, J. P. PEARSON, B. H. IGLEWSKI, J. W. COSTERTON, AND E. P. GREENBERG. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science** 280:295–298. 1998.

DEHIO, C. Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction. **Cell Microbiology** 10(8):1591-8. 2008.

DELMER, D. R.; AMOR, Y. Cellulose Biosynthesis. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 38, 259-290. 1995.

DING, L., YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 54, n. 6, p. 2223-30. 2004

DONINI, I., DE SALVI, D. T. B., FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y; RIBEIRO, S. J. L;. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química.** Vol.34; nº4. 2010.

DROZANSKI, W. 1983. Structure of the rigid layer of *Rhizobium*, cell wall. III. Electron microscopic evidence for the cellulose microfibrils association with peptidoglycan sacculi. **Acta Microbiol.** Pol. 32:161-167

FETT, W. F. , OSMAN, S. F. , DUNN, M. F. Characterization of exopolysaccharides produced by plant-associated fluorescent pseudomonads. **Appl. Environ. Microbiol.** 55:579-83. 1989.

FUQUA, THOMAS e CLAY. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** 61:401–22. 2007

GERLACH R. G., HENSEL M. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. **International Journal of Medical Microbiology.** V 297, p. 401-415, 2007.

GLASER, L. Bacterial cell surface polysaccharides. **Ann. Rev. Biochem.** 42: 91-112, 1973.

HENDERSON, I. R., NAVARRO-GARCIA F., DESVAUX, M., FERNANDEZ, R. C., ALA'ALDEEN, D.; Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol Mol Biol Rev.** Dec;68(4):692-744. 2004

HISAMATSU, M . , YAMADA, T., HIGASHIURA, T . , IKEDA, M. The production of acidic, O-acetylated cyclophorans [cyclic(1-2)3-D-glucans] by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. **Carbohydr. Res.** 163: 115-22. 1987

HENRICHSEN, J.; Bacterial Surface translocation: a survey and classification. **Bacteriol Rev.** 36: 478-503. 1972.

HENRICHSEN, J.; The occurrence of twitching motility among gram-negative bacteria. **Acta Pathol Microbiol Scand.** 83: 171-178. 1975.

HENRICHSEN, J.; Twitching motility. **Annu Rev Microbiol**; 36: 81-93. 1983]

HUECK, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v 62, p. 379-433, 1998. 60

IM, W.T.; YOKOTA, A.; KIM, M.K.; LEE, S.T. *Kaistia adipata* gen. nov., sp. nov., a novel alpha-proteobacterium. **J Gen Appl Microbiol.**, v. 50, p. 249-254, 2004.

JAHN, A. et al. Composition of *Pseudomonas putida* biofilms: accumulation of protein in the biofilm matrix. **Biofouling** 14, 49–57. 2000.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany.** v. 48. n. 308. p. 785-797. 1997.

JUNG, S. Y., LEE, M. H., OH, T. K., & YOON, J. H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 57, p. 2284-2288, 2007

KANG, K. S; COTTRELL, I. W. Em Polysaccharides in Microbial Technology, Pepler, H. J.; Perlman, D., eds.; **Academic Press: New York**, 1979, p. 417.

KANNENBERG, E. L.; REUHS, B. L.; FORSBERG, L. S.; CARLSON, R. W. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structure, biosynthesis and functions. In: The Rhizobiaceae. Ed. H.P. SPAINK; A. KONDOROSI; P.J.J. HOOYKAAS. Dordrecht: **Kluwer Academic Publisher**, pp. 154, 1998.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J Cell. Biol.** 27: 137-138. 1965

KASANA, R. C., SALWAN, r., DHAR, H., DUTT, S., GULATI, A., A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. **Current Microbiology.** V.57 (503-507). 2008.

KIM DY, NISHIYAMA Y & KUGA S., Surface acetylation of bacterial cellulose. *Cellulose* 9: 361–367, 2002.

KIRCHHOF, G., ECKERT, B., STOFFELS, M., BALDANI, J. I., REIS, V. M., HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 157-168, 2001.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.** 43:887-891, 1997.

KOLTER R., GREENBERG, E. P., News & views feature The superficial life of microbes. **Nature**, 2006.

LEIGH, J. A.; SIGNER, E. R.; WALKER, G. C. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** Vol. 82, pp. 6231-6235, Genetics; 1985.

MATTHYSSE, A.G., HOLMES, K.V. AND GURLITZ, R.H. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. **J Bacteriol** 145:583-595. 1981.

LIVAK, K. J. E SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} **Method. Methods** 25: 402–408. 2001.

MATTHYSSE, E. A. G. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infections. **Bacteriol.** 154:906-15. 1983

MATTHYSSE, A. G., THOMAS, D. L. AND WHITE, A. R. Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. **J Bacteriol** 177:1076-1081. 1995

MATTHYSSE, A.G.; MARRY, M.; KRALL, L.; KAYE, M.; RAMEY, B. E. The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 18:1002-10. 2005.

MERCANTE, F. M.; GOI, S. R.; FRANCO, A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbio. Ver. **Univ. Rural.** v. 22, p.65-81, 2002.

MONDS, R. D.; SILBY, M. W.; MAHANTY, H. K. Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. **Mol. Microbiol.** 42:415-26. 2001

MONTEIRO, R. A., BALSANELLI, E.; TULESKI, T. R.; FAORO, H.; CRUZ, L. M.; WASSEM, R.; BAURA, V. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; WEISS, V.; DAROCHA, W. D.; MULLER-SANTOS, M.; CHUBATSU, L. S.; HUERGO, L. F.; PEDROSA, F. O. AND SOUZA, E. M. Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by Suppressive Subtractive Hybridization and partial genome sequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, 2012.

MYLONA, P.; PAWLOSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell.** v. 7. P. 869-885. 1995.

MULLIS, K., FALOONA F. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-catalyzed Chain Reaction. **Methods Enzymol** 155:335-350, 1987

OLIVARES F. L.; JAMES E. K.; BALDANI J. I, DOBEREINER J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytol.** vol.135, p. 723-737, 1997.

PEDROSA, F. O, MONTEIRO, R. A., WASSEM, R., CRUZ, L. M., AYUB, R. A., COLAUTO, N. B., FERNANDEZ, M. A., FUNGARO, M. H. P., GRISARD, E.C., HUNGRIA, M., MADEIRA, H. M. F., NODARI, R. O., OSAKU, C. A.; PETZLERLER, M. L.; TERENCEIO, H.; VIEIRA, L. G. E., STEFFENS, M. B. R., WEISS, V. A., PEREIRA, L.F. P., ALMEIDA, M.I, M., ALVES, L. A., MARIN, A. M., ARAUJO, L.

M.; BALSANELLI, E. , BAURA, V., A.; CHUBATSU, L.; ,FAORO, H.; FAVETTI, A.; FRIEDERMANN, G., GLIENKE, C.; KARP, S.; KAVA-CORDEIRO, V.; RAITTZ, R. T.; RAMOS, H. J. A.; RIBEIRO, E. M. S. F.; RIGO, L. U.; ROCHA, S. N., SCHWAB, S.; SILVA, S. G.; SOUZA, E. M.; TADRA-SFEIR, M. Z.; TORRES, R. A.; DABUL, A. N. G.;SOARES, M.A.M.; GASQUES, L. S.; GIMENES, C.C.T.; VALLE, J.; CIFERRI, R. R.;CORREA, L.C.;MURACE, N.K.; PAMPHILE, J. A.; PATUSSI, E. V.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A.;ROCHA, C.L.M.S.C.; ARANTES, O. M.N.;FURLANETO, M.C.; GODOY, L. P.;OLIVEIRA, C.E.C.; SATORI, D.; VILAS-BOAS, L.A.; WATANABE, M. A. E.; DAMBROS, B. P.; GUERRA, M. P.; MATHIONI, S. M.; SANTOS, K. L.; STEINDEL, M.; VERNAL, J.;BARCELLOS, F. G.; CAMPO, R.J.; CHUEIR, L. M. O.; NICOLA´ S, M. F.; PEREIRA-FERRARI, L.; SILVA, J. L.C.; GIOPPO, N. M. R.; MARGARIDO, V. P.;MENCK-SOARES, M. A.; PINTO, F. G.S.; SIMAˆO, R. C. G.; TAKAHASHI, E. K.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M.; Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses.**PLoS Genetics**. 7(5): e1002064. doi:10.1371. 2011.

PUKATZKI, S; STURTEVANT, D., KRASTINS, B., SARRACINO, D., NELSON, W. C.; HEIDELBERG, J. F.; MEKALANOS, J. J.; Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 31;103(5):1528-33. 2006.

QUINONES, B.; DULLA, G.; LINDOW, S.E. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. **Mol. Plant-Microbe Interact**. 18:682–93. 2005.

ROMLING, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. **Res Microbiol** 153: 205-212. 2002

RONCATO-MACCARI, L. D. B., RAMOS, H. J.O., PEDROSA, F. O., ALQUINI, Y., CHUBATSU, L. S., YATES, M.G., RIGO, L.U.,STEFFENS, M.B., SOUZA, E. M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology ecology**, 45(37-47), 2003 62

ROSS, P., MAYER, R. AND BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiol Rev** 55: 35-58. 1991

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. Characterization of *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov. isolated from surface sterilised wheat roots. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, p. 1341- 1348, 2006.

SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science** 239:487- 491, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning; a laboratory manual. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHMIDT, M.A. Envolvimento do Sistema de Secreção do Tipo III de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* na interação fitopatogênica. Dissertação de Mestrado em Ciências-Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná; 2009.

SILVA V. C. H., Expressão e purificação de proteínas do sistema de secreção do tipo III de *Herbaspirillum seropedicae*. **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR. 2008.

SMIT, G. KIJINE, J.W. LUGTCNBERG, B .J . J. Involvement of both cellulose fibrils and a Ca²⁺ -dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. **Bacteriol.** 1 69:4294-430. 1987.

SOLANO, C.; GARCÍA, B.; VALLE, J., BERASAIN, C.; GHIGO, J.; GAMAZO, C.; LASA, I.; Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**. 43(3), 793-808; 2002.

SOUZA, LC, WULFF NA, GAURIVAUD P, MARIANO AG, VIRGILIO AC, ET AL. Disruption of *Xylella fastidiosa* CVC gumB and gumF genes affects biofilm formation without a detectable influence on exopolysaccharide production. **FEMS Microbiol. Lett.** 257:236. 2006

SOUZA, E.M. Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes nifA e nifB de *Herbaspirillum seropedicae* . p.264. **Tese (Doutorado Ciências-Bioquímica)** - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1990.

SPIERS, A. J., BOHANNON, J., GEHRIG, S. AND RAINEY, P.B. Colonization of the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. **Molecular Microbiology** 50: 15–27. 2003

TSAI, C., AND FRISCH, C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**; 119: 115–119; 1982.

SWISSA, M.; ALONI, Y. WEINHOUSE, H. E BENZIMAN, M.; Intermediary steps in *Acetobacter xylinum* cellulose synthesis: studies with whole cells and cell-free preparations of the wild type and a celluloseless mutant; **Jornal of Bacteriology**, 143, 1142-1150; 1980.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiology**, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VAN GIJSEGEM, F.; VASSE, J.; DE RYCKE, R.; CASTELLO, P.; BOUCHER, C. Genetic dissection of *Ralstonia solanacearum* hrp gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. **Mol Microbiol.** 44(4):935-46; 2002.

VERSTRAETEN, N., BRAEKEN, K., DE BKUMARI, B., FAUVART, M., FRANSAER, J. Living on a surface: swarming and biofilm formation. **Trends in microbiology**, 16: 496-506. 2008

WALKER T.S.; BAIS, H.P.; DEZIEL, E.; SCHWEIZER, H.P.; RAHME, L.G.; *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. **Plant Physiology**; 134:320–31. 2004

WATNICK, P. And KOLTER, R. MINIREVIEW - Biofilm, City of Microbes. **Journal of bacteriology.**, p. 2675–2679 Vol. 182, No. 10. 2000.

WATNICK, P. And KOLTER, R.. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. **Molecular Microbiology** Nov;34(3):586-95. 1999